

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Influência da sedimentação de sólidos em suspensão na dinâmica da contaminação fecal no estuário do Tejo

Sara Alves das Neves Sousa Mendes

Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental

Dissertação orientada por:
Marta Rodrigues, LNEC
Maria Filomena Magalhães, FCUL

2017

Agradecimentos

Por me terem ajuda na realização desta tese quero agradecer:

À Dr.^a Marta Rodrigues por ter aceite orientar esta tese bem como por toda a ajuda prática e paciência despendida. Igualmente à Professora Filomena Magalhães por ter aceite orientar esta tese e por todos os comentários e sugestões dados em revisões;

À Dr.^a Elsa Mesquita pelo acompanhamento ao longo de toda a parte experimental desenvolvida e às boas sugestões e concelhos. Também ao técnico Vítor Napier pelo apoio dado na realização de processos laboratoriais;

Ao Dr. José Menaia pelas revisões, concelhos, ideias e várias sugestões orientadoras do trabalho dadas desde o começo da investigação;

À Dr.^a Paula Freire por facultar bibliografia útil bem como pelo auxílio na parte experimental da análise granulométrica;

Ao técnico Fernando Brito pelo apoio prestado no decorrer dos ensaios na coluna de sedimentação;

À Dr.^a Ana Poças pela ajuda na análise de preparações microscópicas;

E ao projecto da Fundação para a Ciência e Tecnologia UBEST – Understanding the biogeochemical buffering capacity of estuaries relative to climate change and anthropogenic inputs (PTDC/AAG-MAA/6899/2014) e aos projectos do Laboratório Nacional de Engenharia Civil P2I – Gestão ambiental de sistemas aquáticos e P2I – Água e cidade – transição para as cidades do futuro.

Resumo

Palavras-chave: FIB, floculação, sedimentos coesivos, velocidade de queda, radiação UV.

Uma das principais ameaças à qualidade das águas de sistemas aquáticos costeiros é a contaminação microbiológica, que pode afectar negativamente as diversas actividades recreativas, comerciais ou industriais realizadas nestes sistemas. As bactérias indicadoras de contaminação fecal, FIB, são comumente utilizadas na avaliação da qualidade da água destes sistemas. Ao longo dos anos vários estudos têm sido desenvolvidos visando perceber como diversos factores bióticos e abióticos afectam a sobrevivência das bactérias entéricas em meios aquáticos. Estes estudos têm suportado o desenvolvimento de modelos que incorporam as principais variáveis que interferem no decaimento das FIB. Contudo, existem ainda algumas questões por responder, sendo uma das áreas onde ainda existem lacunas de conhecimento a interacção entre os sedimentos e as bactérias. Com vista a melhorar a compreensão da influência dos sedimentos em suspensão na dinâmica das bactérias entéricas na coluna de água, esta investigação analisa a agregação e transporte de *Escherichia coli* (*E. coli*) por sedimentos em suspensão, tendo como caso de estudo o estuário do Tejo.

As amostras de água e sedimentos em suspensão analisadas foram recolhidas em diferentes locais do estuário e a experimentação desenvolveu-se em laboratório, nas instalações do Laboratório Nacional de Engenharia Civil (LNEC), reproduzindo-se tanto quanto possível as condições do meio em que foi feita a amostragem. A experimentação realizada visou perceber a capacidade dos sedimentos em suspensão para adsorver e transportar células de *E. coli*., avaliar a influência dos sedimentos na intensidade e penetração da radiação UV-B, estudar as principais características dos sedimentos em suspensão em determinadas zonas do estuário e obter bases para melhorar a descrição e previsão da evolução de plumas de contaminação fecal em águas de recreio e balneares. O trabalho desenvolvido compreendeu a amostragem de sedimentos em suspensão no estuário do Tejo e o estudo em laboratório das características da água e dos sedimentos amostrados, uma análise do K_d (coeficiente de atenuação vertical da radiação solar) de UV-B nas águas amostradas e a determinação das velocidades de queda dos sedimentos em suspensão.

No estuário do Tejo observaram-se concentrações mais elevadas de *E. coli* durante a baixa-mar face às concentrações de preia-mar, pondo em evidência a importância da maré na dinâmica do transporte de plumas de *E. coli* no estuário. Salientam-se também as correlações positivas encontradas entre a concentração de *E. coli* e a concentração de sólidos suspensos totais (SST) e entre a concentração de SST e a turvação na análise exploratória realizada.

Os resultados obtidos sugerem a existência de agregação de bactérias entéricas aos sedimentos em suspensão, caracterizada por uma variabilidade espacial associada às características dos mesmos, em particular, verificou-se a agregação de *E. coli* aos sedimentos em suspensão que têm tendência a agregarem e formarem flocos. Observou-se também uma diminuição do efeito da radiação solar com concentrações mais elevadas de SST e que a extinção de 90 % da radiação UV-B ocorre até cerca de 1 metro de profundidade, pelo que este efeito deverá ser pouco significativo para o decaimento das bactérias entéricas nas zonas mais profundas do estuário. As diferenças observadas na estrutura e granulometria dos sedimentos em suspensão nos locais amostrados influenciaram também os comportamentos observados no que se refere às velocidades de queda, sugerindo variações das velocidades de queda ao longo do estuário e a influência de processos de floculação em algumas amostras. A velocidade de queda mediana estimada foi de 1,2 mm/s em Algés, 0,24 mm/s em Alcântara e de 0,45 mm/s no Parque das Nações.

Os resultados obtidos contribuem para melhorar a compreensão da influência dos sedimentos em suspensão no transporte de *E. coli*, em particular no estuário do Tejo, e poderão contribuir para a implementação de planos de monitorização mais eficazes e de sistemas de previsão mais fiáveis que permitam antecipar eventos de contaminação fecal.

De modo a complementar, aprofundar e validar os resultados obtidos em desenvolvimentos de investigação futura seria útil a realização de estudos com maior abrangência espacial e temporal e de uma caracterização mais extensiva dos parâmetros ambientais da água e dos sedimentos em suspensão.

Abstract

Key words: FIB, flocculation, cohesive sediments, settling velocity, UV radiation.

One of the major threats to the water quality of coastal aquatic systems is microbiological contamination, which can adversely affect the various recreational, commercial or industrial activities that are performed in these systems. Fecal indicator bacteria, FIB, are commonly used in the evaluation of water quality of aquatic systems. Over the years, several studies have been developed to understand how various biotic and abiotic factors affect the survival of enteric bacteria in aquatic environments. These studies have supported the development of models that incorporate the main variables that interfere in the decay of FIB. However, there are still some unanswered questions, and one of the areas where knowledge gaps still exist is related with the interaction between sediments and bacteria. In order to improve the understanding of the influence of suspended sediments on the dynamics of enteric bacteria in the water column, this investigation analyzes the aggregation and transport of *Escherichia coli* (*E. coli*) by suspended sediments. The study is developed in the Tagus estuary.

The water samples and suspended sediments were collected at different locations in the estuary and the experiments were carried out at the Laboratório Nacional de Engenharia Civil (LNEC), reproducing as much as possible the conditions of the environment in which was sampled. The objective of these experiments were to understand the ability of suspended sediments to adsorb and transport *E. coli*, to evaluate the influence of sediments on the intensity and penetration of UV-B radiation, to study the main characteristics of suspended sediments in certain areas of the estuary and to obtain bases to improve the description and prediction of the evolution of fecal contamination plumes in recreational and bathing waters. The work involved the sampling of suspended sediments in the Tagus estuary and the laboratory study of water characteristics and sediments sampled, an analysis of the UV-B K_d (coefficient of vertical attenuation of solar radiation) in the sampled waters and the determination of the sediment settling velocities.

In the Tagus estuary, higher concentrations of *E. coli* were observed during low tide compared to high tide concentrations, highlighting the importance of the tide in the dynamics of the transport of microbial populations in the estuary. In the exploratory analysis, positive correlations between the concentration of *E. coli* and the concentration of TSS (total suspended solids) and between the concentration of TSS and the turbidity were also observed.

The results obtained suggest the existence of aggregation of enteric bacteria in suspended sediments, characterized by a spatial variability associated to their characteristics, in particular, the aggregation of *E. coli* was verified to suspended sediments that tend to aggregate. There was also a decrease in the effect of solar radiation with higher concentrations of SST and the extinction of 90 % of UV-B radiation occurs near the surface until 1 m deep, so this effect should be less significant for the decay of bacteria in the deepest areas of the estuary. The observed differences in the structure and granulometry of suspended sediments at the sampled sites also influenced the observed velocity behavior, suggesting variations in the settling velocity along the estuary and the influence of flocculation processes in some samples. The estimated median settling velocity was 1,2 mm/s in Algés, 0,24 mm/s in Alcântara and 0,45 mm/s in Parque das Nações.

The results obtained contribute to a better understanding of the influence of suspended sediments on *E. coli* transport, in particular in the Tagus estuary, and may contribute to the implementation of more effective monitoring plans and more reliable forecasting systems to anticipate events of fecal contamination.

In order to complement, deepen and validate the results obtained further studies covering larger spatial and temporal scales and a wider characterization of the environmental parameters of water and suspended sediments would be useful in future research developments.

Índice

Resumo.....	III
Abstract	V
1. Introdução.....	1
1.1 Sistemas aquáticos – Estuários.....	1
1.2 Contaminação microbiológica de estuários.....	2
1.3 Caso de estudo – Estuário do Tejo	5
1.4 Âmbito e objectivos do trabalho.....	6
1.5 Esquema da tese	7
2. Materiais e Métodos	10
2.1 Área de estudo	10
2.2 Amostragem	12
2.3 Métodos experimentais para caracterização da qualidade da água e sedimentos.....	15
2.3.1 Parâmetros físico-químicos	15
2.3.2 <i>Escherichia coli</i>	15
2.3.3 Agregação de <i>E. coli</i> aos sedimentos	16
2.3.4 Determinação de sólidos em suspensão	16
2.3.5 Análise microscópica	18
2.3.6 Determinação de ferro nos sedimentos.....	18
2.4 Coluna de sedimentação.....	20
2.5 Análise granulométrica.....	21
2.6 Análise estatística	22
3. Resultados	23
3.1 Caracterização da água.....	23
3.1.1 Caracterização físico-química e microbiológica da água	23
3.1.2 Exploração de relações entre parâmetros físico-químicos e microbiológicos.....	27
3.1.3 Extinção da radiação UV-B na coluna de água	29
3.2 Caracterização dos sedimentos em suspensão.....	32
3.2.1 Análise microscópica	32
3.2.4 Velocidades de queda	36
4. Discussão.....	39
4.1 Caracterização físico-química e microbiológica	39
4.2 Influência dos sedimentos em suspensão na penetração da radiação solar	40

4.3	Influência dos sedimentos em suspensão para adsorver e transportar células de <i>E. coli</i>	41
4.4	Previsão da qualidade microbiológica da água.....	43
5.	Considerações finais.....	44
6.	Referências	46
I.	Anexos I – fotografias complementares	53
II.	Anexos II – informação complementar	55

Lista de figuras

Figura 2.1 - Distribuição dos sedimentos superficiais e morfologia do estuário do Tejo (Freire, 2000).	11
Figura 2.2 – Área de estudo. Estuário do Tejo e localização dos locais de amostragem, com as respectivas coordenadas. Fonte da imagem de base: Google Maps.....	12
Figura 2.3 - Sondas portáteis multiparamétricas YSI utilizadas nas campanhas (11 de Janeiro de 2017).	13
Figura 2.4 – Garrafa de imersão horizontal utilizada para a recolha de água nas campanhas de 11 de Janeiro e 27 de Abril de 2017.....	14
Figura 2.5 – Montagem experimental com ampolas de decantação para testar a agregação e transporte de <i>E. coli</i> pelos sedimentos suspensos (da esquerda para a direita, amostras dos pontos P1, P2 e P3, respectivamente) (12 de Janeiro de 2017).	16
Figura 2.6 – Método dos tubos múltiplos. Tubo de ensaio à esquerda deu resultado negativo e restantes tubos deram resultado positivo para a presença de <i>E. coli</i> (16 de Janeiro de 2017).	16
Figura 2.7 - Dispositivo de filtração por vácuo (26 de Janeiro de 2017).	17
Figura 2.8 - Filtros com sedimento seco (à direita) e calcinado (à esquerda).	17
Figura 2.9 – Secagem das amostras em banho-maria.....	19
Figura 2.10 - Maceração da amostra após o processo de calcinação.	19
Figura 2.11 - Pesagem de três frações (0,01 g, 0,1 g e 1g) das amostras dos pontos P2, P3 e P4.....	19
Figura 2.12 – Amostras após a digestão ácida.	19
Figura 2.13 – Teste da fenantrolina, padrões utilizados para fazer recta de calibração.	19
Figura 2.14 – Amostras P2, P3 e P4 em três concentrações diferentes em análise pelo método da fenantrolina.....	19
Figura 2.15 - Coluna de sedimentação	20
Figura 2.16 – Equipamento usado na análise de difracção laser.	21
Figura 3.1 – Relação entre concentração de <i>E. coli</i> e de sedimentos em suspensão para a amostragem de 11 de Janeiro.....	27
Figura 3.2 - Relação entre a concentração de sedimentos em suspensão e a turvação para a amostragem de 11 de Janeiro.....	27
Figura 3.3 - Relação entre concentração de <i>E. coli</i> e de sedimentos em suspensão, considerando os dados de todas as campanhas.....	28
Figura 3.4 - Relação entre a concentração de sedimentos em suspensão e a turvação, considerando os dados de todas as campanhas.	28
Figura 3.5 - Relação entre a concentração de <i>E. coli</i> e de sedimentos em suspensão para as amostragens no ponto P2, Algés.	29
Figura 3.6 - Profundidade de extinção de 90% da radiação UV incidente em Algés (P2), Alcântara (P3) e Parque das Nações (P4). PM - preia-mar, BM - baixa-mar, S - superfície, F – fundo.	30
Figura 3.7 – Relação entre a concentração de SST e a profundidade de extinção de 90 % da radiação UV. Símbolos a cheio – Algés, símbolos com linhas – Alcântara, símbolos com pontos - Parque das Nações.	31
Figura 3.8 - Fotos microscópicas do sedimento contido nas amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações (P2, P3 e P4). A1, A2 e A3 – material fresco, B1, B2 e B3 - coloração com Azul de Alcian; C1, C2 e C3 - coloração com azul de Prússia.	32
Figura 3.9 - Distribuição granulométrica dos sedimentos em suspensão de Algés, Alcântara e Parque das Nações, P2, P3 e P4.	33

Figura 3.10 - Evolução da concentração média de sedimentos em suspensão no decorrer dos três ensaios.	36
Figura 3.11 – Percentagem de SSTF e SSTV no início e no fim dos ensaios com amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações, P2, P3 e P4.	37
Figura 3.12 – Velocidade de queda dos sedimentos em função da concentração. Resultados dos ensaios com amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações.	38
Figura I.1 - Pontos de amostragem. A - Valada, P6; B – Alcântara, P3; C – Algés, P2; D – Parque das Nações, P4; E – Caxias, P1 e F – Vila Franca de Xira, P5. Fotos de Algés, Caxias e de Vila Franca De Xira são do Google maps	53
Figura I.2 – coluna de sedimentação com suporte para recipientes de recolha de sub-amostra.....	54
Figura I.3 – Recipientes para recolha de sub-amostras dispostos nos tabuleiros do suporte. Imagem de Ribeiro (2014).	54
Figura II.1 - Caudal médio diário em Almourol de Setembro de 2016 a Janeiro de 2017. A vermelho caudais nos dias das campanhas.	55
Figura II.2 - Evolução da proporção média de matéria orgânica e inorgânica em suspensão durante o ensaio com a amostra de Algés.	59
Figura II.3 - Evolução da proporção média de matéria orgânica e inorgânica em suspensão durante o ensaio com a amostra de Alcântara.	59
Figura II.4 - Evolução da proporção média de matéria orgânica e inorgânica em suspensão durante o ensaio com a amostra do Parque das Nações.	59

Lista de tabelas

Tabela 1.1 – Normas de qualidade microbiológica para as águas balneares de acordo com a Directiva das Águas Balneares.....	3
Tabela 1.2 – Inativação de <i>E. coli</i> através de radiação. T_{90} - Taxa de decaimento para 90% da população inicial de <i>E. coli</i> , T_{99} - Taxa de decaimento para 99% da população inicial de <i>E. coli</i> , E – evento pluvial.	8
Tabela 1.3 – Valores médios, máximos e mínimos de FIB no estuário do Tejo. Amostragens realizadas no período de 1985 a 2015. Valores calculados com base em dados disponíveis no SNIRH (http://snirh.pt). I – ano em que se iniciaram as amostragens, F – ano em que foi realizada a última amostragem, N – número de amostras contabilizadas, máx. – máximo e mín. – mínimo. O período em que foram realizadas as colheitas difere entre as estações.	9
Tabela 2.1 – Descrição genérica das campanhas e dados das amplitudes de maré e caudais médios do rio Tejo.	14
Tabela 3.1 – Parâmetros de qualidade da água medidos na campanha de 28 de Novembro de 2016. Temp. – temperatura, CE – condutividade específica, OD – oxigénio dissolvido e SST – sólidos suspensos totais.	23
Tabela 3.2 – Concentração e respectiva percentagem de SSTF e SSTV das amostras recolhidas na campanha de 28 de Novembro.	24
Tabela 3.3 - Parâmetros de qualidade da água medidos na campanha de 11 de Janeiro de 2017. Temp. – temperatura, CE – condutividade específica, Sal. – salinidade e Turv. – turvação.....	25
Tabela 3.4 – Concentração e respectiva percentagem de SSTF e V das amostras recolhidas na campanha de 11 de Janeiro.....	26
Tabela 3.5 - Valores do coeficiente de atenuação vertical obtidos para as amostras da campanha de 11 de Janeiro.....	30
Tabela 3.6 – Teste da agregação de <i>E. coli</i> ao sedimento. Valor de NMP/100 mL para Algés, Alcântara e Parque das Nações (pontos P2, P3 e P4). Resultados das campanhas de 11 de Janeiro e de 27 de Abril. t_0 - momento inicial da experiência e t_1 – 24h após o início da experiência.	35
Tabela II.1 – Horas a que foram realizadas as colheitas na campanha de 11 de Janeiro.....	56
Tabela II.2 – Resultados das análises em laboratório para as campanhas de 28 de Novembro, 5 de Dezembro e de 27 de Abril.....	56
Tabela II.3 - Resultados das análises em laboratório para a campanha de 11 de Janeiro.....	57
Tabela II.4 – Absorvâncias para três comprimentos de onda de radiação UV nas amostras da campanha de 11 de Janeiro.....	57
Tabela II.5 – Resultados de SST e velocidades de queda para ensaio com amostra de Algés.....	58
Tabela II.6 - Resultados de SST e velocidades de queda para ensaio com amostra de Alcântara.	58
Tabela II.7 - Resultados de SST e velocidades de queda para ensaio com amostra do Parque das Nações.	58

Listas de abreviaturas e siglas

AMB - bactérias mesofílicas aeróbicas

CE – condutividade específica

CF - coliformes fecais

CT - coliformes totais

DAB – Directiva das Águas Balneares

ENT – enterococos

ETAR – estação de tratamento de águas residuais

EPS – substâncias poliméricas extracelulares

FIB - bactérias indicadoras de contaminação fecal

K_d – coeficiente de atenuação vertical da radiação solar

NMP – número mais provável

SST – sólidos suspensos totais

SSTF - sólidos suspensos totais fixos

SSTV – sólidos suspensos totais voláteis

T_{90} – taxa de decaimento para 90 % da população inicial

T_{99} - taxa de decaimento para 99 % da população inicial

t_n – instante de tempo n

UFC – unidades formadoras de colónias

1. Introdução

1.1 Sistemas aquáticos – Estuários

Desde cedo na história da humanidade tem-se verificado uma tendência para as sociedades se formarem e estabelecerem juntos de sistemas aquáticos. Isto sucede, em grande medida, pela disponibilidade de recursos, que satisfazem necessidades biológicas humanas, bem como pela possibilidade de instalar diversas infraestruturas, como os portos que permitem o transporte de pessoas e mercadorias e contribuem para o desenvolvimento económico (Belkin e Colwell, 2005).

Um dos ecossistemas mais produtivos do planeta são os estuários, sistemas aquáticos que fazem a transição entre o rio e o mar e que se caracterizam por amplas flutuações ambientais (e.g., salinidade, ciclo de marés). A dinâmica entre água doce e água salgada, bem como o transporte de sedimentos e outro material em suspensão proveniente do mar e dos rios, faz com que a biota presente nestes sistemas evidencie características adaptativas bastante peculiares (McLusky e Elliott, 2004; Pinto-Coelho e Havens, 2016).

Outra particularidade destes ecossistemas é terem uma grande riqueza e diversidade de espécies apresentando características funcionais únicas quando comparados com outros ecossistemas aquáticos (Pinto-Coelho e Havens, 2016). Visto tratarem-se de zonas confinadas, com condições pouco propícias à presença de grandes predadores, tornam-se úteis como local de abrigo e áreas de reprodução para muitas espécies de peixes, aves, plantas e outros organismos, e ainda como óptimos locais de alimentação para aves migratórias. (McLusky e Elliott, 2004; Pinto-Coelho e Havens, 2016).

Para além das tradicionais actividades de pesca e de navegação, nas últimas décadas tem-se verificado uma crescente procura dos sistemas aquáticos para a prática de actividades de lazer, recreação e desporto. Dado que muitas vezes os estuários se encontram a uma curta distância das cidades, estes mostram-se como uma boa opção, para aqueles que procuram o contacto com a natureza (Belkin e Colwell, 2005). Esta proximidade das cidades leva a que nas margens estuarinas se desenvolvam também diversas actividades urbanas, industriais e agro-pecuárias, sendo os estuários utilizados como meio receptor dos efluentes destas actividades, o que poderá afetar a sua qualidade ecológica, particularmente quando o tratamento dos efluentes descarregados é insuficiente.

Mais, a importância dos estuários é distintamente destacada nos muitos serviços de ecossistema que providenciam à humanidade (Millennium Ecosystem Assessment, 2005; Barbier et al., 2011). Destes serviços é de salientar o papel que exercem em importantes funções reguladoras. Por exemplo, os estuários servem de “sistema tampão” por impedir que os efeitos de grandes tempestades oceânicas se propagem pela zona costeira adjacente de forma tão acentuada sendo de grande relevância para a segurança de uma grande percentagem da população (Pinto-Coelho e Havens, 2016). Ainda dentro dos serviços de regulação mais importantes, desempenhados por este ecossistema, temos o controlo de inundações e o controlo de poluição e desintoxicação por meio da retenção, recuperação e remoção de excesso de nutrientes e contaminantes (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Quanto a serviços de provisionamento os mais relevantes são a produção de alimento (peixe, algas e invertebrados), de fibra, de madeira e de combustível. Os estuários providenciam também diversos serviços culturais, proporcionando momentos de inspiração, bem-estar e áreas de recreio (Millennium Ecosystem Assessment, 2005).

Apesar das grandes variações cíclicas nos parâmetros ambientais e da resiliência que apresentam perante fenómenos naturais (Pinto-Coelho e Havens, 2016), os estuários são particularmente sensíveis às mudanças climáticas (e.g., Statham, 2012) e às muitas ameaças provocadas pelo Homem, tais como a introdução de substâncias tóxicas, a sobreexploração de recursos, entre outros (e.g., Rabalais et al., 2009), que podem resultar em alterações da sua dinâmica natural e/ou perdas permanentes no sistema estuarino (Jiang et al., 2014; Bernardino et al., 2015; Robins et al., 2016; Wang et al., 2017). Deste modo, os aspectos acima descritos evidenciam que qualquer contributo para conservar, proteger ou recuperar a qualidade ambiental e sanitária dos ecossistemas estuarinos é de grande relevância.

1.2 Contaminação microbiológica de estuários

Com o desenvolvimento industrial e o crescimento populacional as pressões exercidas pelo Homem no meio ambiente têm vindo a aumentar e as repercussões da actividade humana tornam-se visíveis em praticamente todos os sistemas ecológicos (Ellis, 2011; Sullivan et al., 2014; Nagelkerken e Connell, 2015; Becker et al., 2016; Boivin et al., 2016). Um exemplo disso é a contaminação aquática, que tendo diversas fontes, como as águas residuais domésticas, indústrias, pluviais e agrícolas sem tratamento ou insuficientemente tratadas, afecta diversos biomas aquáticos. Esta é uma das principais formas de pressão humana em muitos estuários, especialmente os que se situam junto de grandes áreas urbanas (McLusky e Elliott, 2004). Deste modo, a contaminação microbiológica proveniente de efluentes urbanos não tratados ou insuficientemente tratados, é uma ameaça comum à qualidade da água dos estuários.

A qualidade microbiológica da água num sistema aquático é normalmente avaliada pela quantificação de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB - *fecal indicator bacteria*), isto porque a sua presença sugere a existência de microrganismos patogénicos de origem entérica bem como a sua ausência sugere a ausência de tais patogénicos (Nienie et al., 2017). Tanto quanto possível, as FIB não deverão multiplicar-se fora do ambiente entérico, e deverão ter taxas de sobrevivência idênticas ou superiores às dos microrganismos patogénicos (Cabral, 2010). As FIB compreendem diferentes grupos de bactérias, sendo os mais frequentemente usados, por ordem decrescente, os coliformes totais (CT), os enterococos (ENT) e as bactérias mesofílicas aeróbicas (AMB) (Nienie et al., 2017). A espécie *Escherichia coli* (*E. coli*), pertencente aos coliformes fecais (CF), um subconjunto das bactérias CT, é dos microrganismos mais utilizados neste tipo de estudos (Ismail et al., 2016; Nienie et al., 2017; Symonds et al., 2017). *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, oxidase-negativa, catalase positiva que fermenta a lactose e faz parte do microbiota intestinal do ser humano e de animais homeotérmicos (Palazón, 2017). Além da sua representatividade na microflora intestinal humana e animal, a sua utilização como indicador da qualidade microbiológica da água deve-se ao facto de na sua generalidade as estirpes que ocorrem nos intestinos não serem patogénicas, bem como à simplicidade, fiabilidade e baixo custo dos métodos usados para a sua quantificação (Cabral, 2010; Dolores et al., 2016; Palazón, 2017).

A importância da utilização de FIB para avaliar a qualidade microbiológica da água está bem patente nas recomendações e legislação internacionais e nacionais. (WHO, 2003; Diretiva das Águas Balneares (DAB)). No que respeita à legislação vigente o principal instrumento da política da União Europeia relativo à água é a Directiva Quadro da Água (Directiva 2000/60/CE de 23 de Outubro de 2000), que visa a protecção das águas de superfície interiores, de transição, costeiras e subterrâneas, e que foi transposta para a legislação portuguesa através da Lei da Água (Lei nº58/2005 de 29 de Dezembro), alterada e republicada pelo Decreto-Lei n.º 130/2012, de 22 de Junho. Outros instrumentos

importantes para a gestão da água são a Directiva das Águas Balneares (Directiva 2006/7/CE de 15 de Fevereiro), transposta para a ordem jurídica nacional pelo Decreto-Lei n.º 135/2009 de 3 de Junho, alterado pelo Decreto-Lei n.º 113/2012 de 23 de Maio e que estabelece o processo de avaliação da qualidade das águas balneares cujos critérios são apresentados na Tabela 1.1; a Directiva das Águas Residuais Urbanas (Directiva 91/271/CEE de 21 de Maio de 1991) alterada pela Directiva 98/15/CE de 27 de Fevereiro de 1998 e transpostas para o direito nacional, respectivamente, pelo Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de Junho e pelo Decreto-Lei n.º 348/98, de 9 de Novembro, sendo posteriormente alterada, e que diz respeito à recolha, tratamento e descarga de águas residuais urbanas e de determinados sectores industriais; e a Directiva Nitratos (Directiva 91/676/CEE de 12 de Dezembro de 1991) transposta pelo Decreto-Lei n.º 235/97, de 3 de Setembro (alterado pelo Decreto-Lei n.º 68/99, de 11 de Março) e pelo Decreto Legislativo Regional n.º 6/2005/A, de 17 de maio de 2005, relativa à protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola (APA, acedido em Julho de 2017).

Tabela 1.1 – Normas de qualidade microbiológica para as águas balneares de acordo com a Directiva das Águas Balneares.

	Parâmetro	Qualidade			Imprópria para banhos
		Excelente	Boa	Aceitável	
Águas costeiras e de transição	Enterococos intestinais (ufc/100ml)	100*	200*	185**	350
	<i>E. coli</i> (ufc/100ml)	250*	500*	500**	1200
Águas interiores	Enterococos intestinais (ufc/100ml)	200*	400*	330**	660
	<i>E. coli</i> (ufc/100ml)	500*	1000*	900**	1800

*com base numa avaliação de percentil 95 **com base numa avaliação de percentil 90

A sobrevivência das bactérias entéricas em meio aquático depende de vários factores abióticos e bióticos, como a radiação solar, o stress por inanição, depleção de nutrientes, pressão, alterações de temperatura, salinidade e pH (Rozen e Belkin, 2001). Especificamente no caso das alterações climáticas e de temperatura alguns estudos apontam para uma ligação entre as taxas de sobrevivência das FIB e as estações do ano (Mika et al., 2009; Rochelle-Newall et al., 2015; Nguyen et al., 2016). Também a coexistência de outras bactérias, vírus e predadores e a capacidade metabólica do próprio organismo podem determinar a sobrevivência de *E. coli* (Rochelle-Newall et al., 2015).

A radiação solar é, no entanto, considerada o principal agente bactericida que afecta estas bactérias aquando da sua presença em meio aquático, sendo a radiação na gama UV a mais eficaz na inactivação celular das mesmas (Vermeulen et al., 2007). Mais, apesar da radiação visível e da radiação UVA apresentarem um contributo importante na inactivação celular, a radiação UVB é a que se evidencia como mais prejudicial para as bactérias (Maraccini et al., 2016, 2016a). A inactivação de bactérias através da radiação solar é, assim, um mecanismo natural de eliminação de contaminantes, importante nos sistemas aquáticos, em especial nos estuários e águas costeiras (Rochelle-Newall et al., 2015). Na Tabela 1.2 são apresentados alguns dados referentes à inactivação de *E. coli* pela radiação solar, sendo evidente que existe uma grande variabilidade nos valores de acordo com o local de origem da água e processos experimentais utilizados, por exemplo, os tempos de inativação para 90 % da população de bactérias variam entre alguns minutos e mais de 24h. A importância da radiação solar enquanto agente bactericida pode, contudo, ser sobrevalorizada se não for feita uma análise conjunta de todos os factores envolvidos num determinado contexto natural. Existem outros factores, como por

exemplo a profundidade ou a presença de material em suspensão, que não devem ser ignoradas neste tipo de análise.

A taxa de mortalidade por efeito da radiação solar é influenciada pela profundidade do seguinte modo: quanto maior for a profundidade a que se encontram os microrganismos menor será a penetração dos raios solares e, conseqüentemente, o efeito bactericida também diminuirá. Além da diminuição da intensidade de radiação ao longo da coluna de água devido à refração existem outros factores hidrometeorológicos (Whitman et al., 2004) ou físico-químicos, como por exemplo a existência de partículas em suspensão e substâncias dissolvidas na água, que interferem na passagem da luz por absorverem ou reflectirem a radiação. Deste modo, informação relativa ao coeficiente de atenuação vertical da radiação solar (K_d) é complementar aquando da avaliação do efeito da radiação solar como agente bactericida num determinado sistema aquático. A presença de sedimentos em suspensão, em particular, pode interferir na acção da radiação como agente bactericida isto porque existe associação entre os microrganismos e estas partículas que se encontram na coluna de água – hipótese sustentada pela formação de uma fina camada de carboidratos resultantes de processos biológicos onde as bactérias e outros microrganismos formam comunidades, o biofilme, que facilita a agregação das bactérias bem como pela presença de diferentes microhabitats, na constituição das partículas, capazes de suportar diversas populações de protistas heterotróficos aeróbios e anaeróbios, bactérias e seus vírus (Belkin e Colwell, 2005; Perkins et al., 2014; Rochelle-Newall et al., 2015). A presença de sedimentos em suspensão na coluna de água contribui, assim, para a sobrevivência de bactérias como *E. coli* visto que actuam como uma barreira protectora contra a radiação solar e contra predadores e ainda porque facilitam o acesso a nutrientes (Dolores et al., 2016).

Os sedimentos em suspensão podem, assim, influenciar significativamente a sobrevivência e propagação de agentes patogénicos na água e como observado por Yang et al. (2017), nas últimas décadas vários estudos têm-se concentrado numa melhor compreensão das suas características e comportamento, em particular no que respeita aos parâmetros que afectam e dos quais depende o processo de floculação.

A floculação, ou seja, a agregação de partículas que se encontram em suspensão na água e que colidem entre si, formando estruturas fractais de maiores dimensões, é um processo que pode ser promovido pela presença de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), polissacarídeos produzidos por microrganismos, entre os quais as FIB. Foi verificado que sedimentos com maior percentagem de limo e/ou argila – sedimento fino - e com teor de matéria orgânica apresentam uma correlação positiva com a abundância de FIB (Kinnaman et al., 2012; Perkins et al., 2014). Deste modo, conclui-se que sedimentos finos coesivos têm maior propensão para flocular.

Este comportamento de agregação vai provocar nos sedimentos em suspensão alterações na forma como sedimentam, o que será particularmente evidente na velocidade de queda dos sedimentos. Deste modo, apesar das diferenças na velocidade de queda dos sedimentos em suspensão em estuários estar primariamente associada à concentração dos sedimentos em suspensão (Leussen, 1999), na verdade a capacidade de floculação pode contribuir até mesmo de forma equivalente à concentração de sedimentos em suspensão para a determinação do tamanho dos flocos (Yang et al., 2017) e, conseqüentemente, para a velocidade de queda dos sedimentos. Note-se ainda que os diferentes parâmetros contribuem de forma distinta para a formação dos flocos, nomeadamente, o aumento da concentração de sedimentos em suspensão, tal como acontece com a turbulência, provocam o aumento do número de colisões entre as partículas por unidade de tempo, enquanto que os factores físico-químicos e os parâmetros biológicos têm como efeito o aumento da eficácia das colisões (Leussen, 1999). A velocidade de queda dos sedimentos em suspensão é ainda influenciada por outros parâmetros como

a salinidade (Portela et al., 2013), o revestimento dos sedimentos por substâncias metálicas (Leussen, 1999) e por biofilme (Shang et al., 2014), o tamanho, densidade efectiva e dimensão fractal dos flocos e a turbulência (Yang et al., 2017).

Melhorar a compreensão dos processos que afectam a sobrevivência das bactérias entéricas nos meios aquáticos é, assim, fundamental para apoiar a gestão destes sistemas. Em particular, permite apoiar o estabelecimento de planos de monitorização e de sistemas de previsão que permitam perceber a evolução de FIB nos meios aquáticos (e.g. David et al., 2015), garantindo uma maior representatividade e fiabilidade das observações e previsões obtidas. Avanços neste sentido contribuem não só para uma melhor gestão e controlo da qualidade dos sistemas aquáticos, mas em especial para a previsão antecipada de ameaças à saúde pública.

1.3 Caso de estudo – Estuário do Tejo

O estuário do Tejo, localizado na costa ocidental de Portugal, é um dos maiores estuários da Europa com uma área de cerca de 320 km² (APA, 2016). Junto deste estuário desenvolveu-se aquela que é actualmente a cidade mais populosa do país, Lisboa, em cujo distrito habitam cerca de 2.8 milhões de pessoas (INE, acedido em Junho de 2017). É também relevante salientar que a área de tecido urbano nas margens deste estuário compreende 18 concelhos (APA, 2012). O presente trabalho tem como objecto de estudo este sistema aquático estuarino.

Tal como é característico dos sistemas estuarinos, o estuário do Tejo tem uma enorme diversidade biológica e paisagística. Trata-se de um ecossistema com grande produtividade biológica quer associada aos habitats de zona húmida, uma das mais importantes a nível europeu, quer aos habitats terrestres e tem uma notável produção de biomassa (APA, 2016a). É um ecossistema com enorme relevância pelos serviços de ecossistema que disponibiliza e é também uma área com grande valor a nível económico para o país, pelos muitos recursos que disponibiliza, destacando-se a manutenção dos *stocks* de pescado (ICNF, em Junho de 2017). O evidente valor ecológico é demarcado pela importância como zona de reprodução, local de alimentação e de passagem de espécies migratórias e pela riqueza específica que caracteriza esta região com especial enfoque na avifauna (APA, 2016b). Por forma a conservar estes valores naturais e por reconhecimento do seu valor singular, o estuário do Tejo tem o estatuto de área protegida, sendo classificado a nível nacional como Reserva Natural, e a nível internacional como Sítio Ramsar, Zona de Protecção Especial e Sítio da lista nacional de Sítios da Rede Natura 2000.

A zona marginal do estuário do Tejo é ocupada por zonas urbanas (34 %) e por áreas de onde se desenvolvem actividades com peso na economia nacional, áreas agrícolas (35 %) e áreas com instalações industriais, portuárias e aeroportuárias (24 %) (Rilo et al., 2012). É ainda um sistema aquático muito utilizado para fins recreativos, visto que dispõe de algumas zonas balneares e é comumente utilizado para a prática de actividades náuticas e pesca recreativa, motivo pelo qual o controlo da qualidade da água deste ecossistema apresenta relevância ao nível da saúde pública.

Similarmente a muitos outros casos de grandes cidades que se desenvolveram junto de um sistema aquático, ao longo dos anos grandes quantidades de efluentes domésticos e industriais têm sido depositados nas águas do estuário do Tejo, sendo muitas destas descargas indevidas, ilegais e não tratadas, sucedido que se tem prolongado até anos recentes (CML, 2014). A sub-bacia hidrográfica do estuário do Tejo é uma zona com precedentes de contaminação proveniente de indústrias química e

metalo-mecânica, tendo sido criados vários projectos com a finalidade de recuperação ambiental (APA, 2012). É ainda conhecida a ocorrência de eventos de contaminação pontual de elevada toxicidade que podem colocar em risco a execução de actividades como a apanha de marisco, ou o uso balnear que não comprometem o equilíbrio ecológico do sistema e que são frequentes neste local. Por fim, é de salientar que parte da margem sul do estuário está classificada como zona sensível, excluindo o critério nutrientes, por incumprimento nas concentrações de *E. coli* (APA, 2012). Alguns valores de concentrações de indicadores microbiológicos observados no estuário do Tejo em diferentes períodos nos últimos 30 anos são apresentados na Tabela 1.3.

Com vista à melhoria dos serviços de saneamento de águas residuais e consequentemente da qualidade da água dos sistemas naturais, nas últimas décadas houve um aumento do número de infra-estruturas de tratamento de águas residuais (ETAR). Actualmente, a grande maioria das descargas efectuadas na região hidrográfica do Tejo é sujeita a tratamento secundário (79,4 % das ETAR) e 14 % das ETAR tem um tratamento mais avançado que o secundário (APA, 2016). Relativamente ao estuário do Tejo (águas de transição) todas as massas de água foram classificadas sendo obtidos os resultados de um estado Bom ou Superior para apenas 25 % das massas de água e de estado Inferior a Bom para os restantes 75 % das massas de água, segundo a Directiva Quadro da Água (APA, 2016).

1.4 Âmbito e objectivos do trabalho

Com este estudo pretende-se compreender melhor o transporte de *E. coli* pelos sedimentos em suspensão e avaliar a importância deste processo na distribuição espacial e temporal das populações microbianas em estudo em ambiente aquático. Mais especificamente, será estudada a importância da agregação de *E. coli* aos sedimentos em suspensão e, indirectamente, a influência deste processo na evolução das plumas de contaminação fecal em águas estuarinas.

Espera-se que com os resultados obtidos neste estudo, juntamente com informação já publicada e dados históricos de monitorização e modelação do estuário do Tejo, se possam obter bases para melhorar a descrição e previsão da evolução de plumas de contaminação fecal em águas de recreio e balneares dos sistemas estuarinos em geral, bem como dar um contributo para a preservação do estuário do Tejo.

Como objectivos específicos deste trabalho pretende-se:

- Perceber a capacidade dos sedimentos em suspensão para adsorver e transportar células de *E. coli*., testando a agregação das bactérias ao sedimento;
- Avaliar a influência dos sedimentos na intensidade e penetração da radiação solar através da determinação dos coeficientes de atenuação de UV-B;
- Estudar as principais características dos sedimentos em suspensão em determinadas zonas do estuário, incluindo a velocidade de queda dos mesmos, e compreender como estas poderão afectar a agregação e o transporte de bactérias;
- Obter bases para melhorar a descrição e previsão da evolução de plumas de contaminação fecal em águas de recreio e balneares.

Tendo em vista os objectivos, o trabalho desenvolvido compreendeu a amostragem de sedimentos em suspensão no estuário do Tejo e o estudo em laboratório das características físico-químicas, da água e dos sedimentos amostrados, bem como da capacidade dos sedimentos para adsorver

e transportar células de *E. coli.*, reproduzindo-se tanto quanto possível as condições do meio em que foi feita a amostragem. Dado que a presença de sedimentos em suspensão atenua a intensidade e penetração da radiação solar, deste modo enfraquecendo ou anulando a acção bactericida da mesma, foi também realizada uma análise do K_d de UV-B nas águas amostradas. Por fim, foram ainda determinadas as velocidades de queda dos sedimentos amostrados.

1.5 Esquema da tese

A tese encontra-se dividida em 5 capítulos. No presente capítulo, Introdução, pretendeu-se contextualizar a investigação realizada e suportar a sua relevância tanto pela observação da grande variedade de factores que influenciam esta problemática da propagação dos patogénicos fecais na água, como também pela constatação de que estudos realizados nesta área do conhecimento revertem em aplicações práticas no campo da saúde pública. De seguida é apresentado o capítulo Materiais e Métodos onde é feita a descrição da área de estudo e da parte experimental do trabalho, incluindo os procedimentos de trabalho desenvolvidos em campo e em laboratório. Os terceiro e quarto capítulos referem-se aos Resultados obtidos e à Discussão dos mesmos. Por fim o último capítulo refere-se às Considerações Finais e expõe as principais conclusões obtidas neste estudo e as considerações para investigação futura. A tese compreende ainda dois anexos com informação complementar.

Tabela 1.2 – Inativação de *E. coli* através de radiação. T₉₀ - Taxa de decaimento para 90% da população inicial de *E. coli*, T₉₉ - Taxa de decaimento para 99% da população inicial de *E. coli*, E – evento pluvial.

Artigos	Condições experimentais		Temperatura	Radiação	T ₉₀	T ₉₉	Tipo de Experimentação	Observações	Referências
I	Luz		0,5°C	>290nm	50min		Laboratório	Água de mar recolhida na Davis Station, Antártida.	Statham e McMeekin, 1994
				>320nm	2h50		Laboratório		
				>370nm	5h		Laboratório		
	Luz		3°C	2,7*10 ⁻² W/m² PAR	50/90min		Exterior Controlado		
	Escuro		0,5°C	-	>8 dias		Laboratório		
II	Luz	com sedimentos	24,2 ± 3,25	0 - 800W/m²		70,6h	Exterior Controlado	Água e sedimentos de rio recolhidos na Província de Salta, Argentina. Luz natural	Gutiérrez-Cacciabue et al., 2016
	Escuro	sem sedimentos	23,9 ± 4,08	-		219,3h	Exterior Controlado		
		com sedimentos				1354,5h	Exterior Controlado		
III ATCC 35218 ATCC 8739	Escuro			-	42,5h		Laboratório	Água do mar esterilizada em autoclave.	Jović et al., 2014
	Luz		12°, 18° e 24°C	258 - 693 W/m²	0,30-0,82h		Laboratório		
	Luz				0,31-5,53h		Laboratório		
	Escuro				-	33,55h			
IV	Luz			350 - 450nm	182 ± 15min		Laboratório	Água mineral. Estudo desenvolvido na Suíça.	Berney et al., 2006
V	Luz			Radiação solar	1 dia		Laboratório	Água do estuário Cochín, Índia. Luz natural.	Chandran e Hatha, 2005
	Escuro	factores bióticos	30°C	-	1 dia		Laboratório		
	Escuro	factores bióticos	20°C	-	≈ 1,4 dias		Laboratório		
VII	Coluna de água			Radiação solar	21,7h		Campo	Contaminação microbiana resultante de dois eventos de escoamento de águas pluviais urbanas para o estuário do Lago Pontchartrain, EUA.	Jeng et al., 2005
	E1	Sedimentos		Radiação solar	60,5h		Campo		
	E2	Coluna de água		Radiação solar	13,5h		Campo		
		Sedimentos		Radiação solar	100h		Campo		

Tabela 1.3 – Valores médios, máximos e mínimos de FIB no estuário do Tejo. Amostragens realizadas no período de 1985 a 2015. Valores calculados com base em dados disponíveis no SNIRH (<http://snirh.pt>). I – ano em que se iniciaram as amostragens, F – ano em que foi realizada a última amostragem, N – número de amostras contabilizadas, máx. – máximo e mín. – mínimo. O período em que foram realizadas as colheitas difere entre as estações.

	Estações	Coordenadas	Coliformes fecais (NMP/100ml) (máx.; média; mín.)	I - F (N)	<i>E. coli</i> (NMP/100ml) (máx.; média; mín.)	I - F (N)
Montante	Valada	39°5'1,9"N; 8°45'11,5"W	1,50E+05 1,70E+03 0,00E+00	1995 1907 (243)		
	Cais Cabo (Vila Franca de Xira)	38°57'8,6" N; 8°58'37,7" W	3,30E+04 2,02E+03 0,00E+00	1985 – 1993 (46)		
	Esteiro Montijo	38°41'56,4"N; 9°0'19,9"W	8,40E+04 7,44E+02 1,00E+01	1999 – 2002 (37)		
	Esteiro Moita	38°41'30,3"N; 9°1'4,3"W	1,00E+04 6,88E+02 6,00E+00	1999 – 2002 (36)		
	Ponta dos Corvos*	38°38'56,5"N; 9°6'1,4"W			3,55E+03 7,25E+02 1,50E+01	2013 – 2015 (24)
	Estreito Seixal	38°38'44"N; 9°6'17,9"W	2,70E+04 4,28E+03 1,50E+02	1999 – 2002 (37)		
	Esteiro Coina	38°37'53,4"N; 9°3'53,2"W	2,60E+04 3,93E+03 8,00E+01	1999 – 2002 (37)		
	Cova do Vapor*	38°39'43,2"N; 9°15'35"W	9,20E+01 1,18E+01 0,00E+00	2002 – 2007 (41)	1,44E+02 2,22E+01 1,50E+01	2013 – 2016 (20)
	Caxias*	38°41'52,8"N; 9°16'25,7"W			5,29E+02 9,28E+01 1,50E+01	2013 – 2016 (25)
	Paço de Arcos*	38°41'23,9"N; 9°17'49,4"W			7,82E+02 1,45E+02 1,50E+01	2013 – 2016 (27)
Jusante	Santo Amaro*	38°41'3,5"N; 9°18'43"W			4,61E+02 7,17E+01 1,50E+01	2013 – 2016 (23)
	Torre*	38°40'31,7"N; 9°19'22,8"W	5,40E+03 3,17E+02 4,00E+00	1995 – 2007 (170)	7,70E+01 2,83E+01 1,50E+01	2013 – 2016 (23)

*Estações em águas balneares.

2. Materiais e Métodos

2.1 Área de estudo

Como já referido, o presente trabalho foi desenvolvido no estuário do Tejo. O rio Tejo, principal afluente do estuário do Tejo, é o rio mais extenso da Península Ibérica, com uma linha de água com 1100 Km de comprimento e com um caudal médio de 336 m³/s. Com nascente na Serra de Albarracín (Aragão, Espanha) e foz no Oceano Atlântico (Lisboa, Portugal), o Tejo drena uma área total de 80 mil Km², 31% dos quais em território português, e é o principal afluente do estuário do Tejo com um caudal médio de 336 m³/s (APA, 2012; APA, 2016). O rio Sorraia, na margem esquerda, e o rio Trancão, na margem direita, são outros dois afluentes que também contribuem significativamente para o caudal de água doce afluente ao estuário, e em conjunto estes três afluentes asseguram um caudal médio de cerca de 400 m³/s (Rodrigues et al., 2017; ICNF acedido em Junho de 2017).

A circulação no estuário do Tejo é principalmente controlada pela maré, mas parâmetros como o caudal fluvial, o vento, a pressão atmosférica e as ondas superficiais também apresentam importante influência (Rodrigues e Fortunato, submetido). Relativamente à maré, esta apresenta um padrão semi-diurno com amplitude média de 2,6 m, sendo o estuário classificado como mesotidal (Salgado et al., 2007; ICNF acedido em Junho de 2017). A amplitude de maré varia entre 0,55 m e 3,86 m em Cascais (Guerreiro et al., 2015). A propagação da maré no estuário é complexa, com um aumento da amplitude para montante devido a efeitos de ressonância (Fortunato et al., 1997, 1999). A área intertidal do estuário é de cerca de 43 % da sua superfície total (Castanheiro, 1986).

O estuário apresenta uma embocadura profunda (profundidade máxima de 46 m), longa e estreita com ligação ao Oceano Atlântico, contrastando com a bacia interior pouco profunda e extensa (largura máxima de 15 Km) com importantes áreas de sapal (Freire et al., 1999; Freire et al., 2006). A grande maioria dos sedimentos no estuário do Tejo são de origem fluvial, resultante de erosão e verifica-se uma elevada sedimentação na zona terminal do estuário, que ocorre devido à deposição de sedimentos finos arenosos trazidos pelas marés do oceano e arrastados para o interior do estuário (Figura 2.1) (Cabral H., 1998; Freire et al., 2006). Os sapais do estuário do Tejo têm como principais constituintes limo e argila, representado a areia menos de 5 % da sua composição (Franz et al., 2014). Os índices de turbidez na coluna de água do estuário são elevados, sendo a turbidez máxima de 1100 mg/L com extensão e localização variáveis como resultado da amplitude de maré (Cabral H., 1998; Freire et al., 2006).

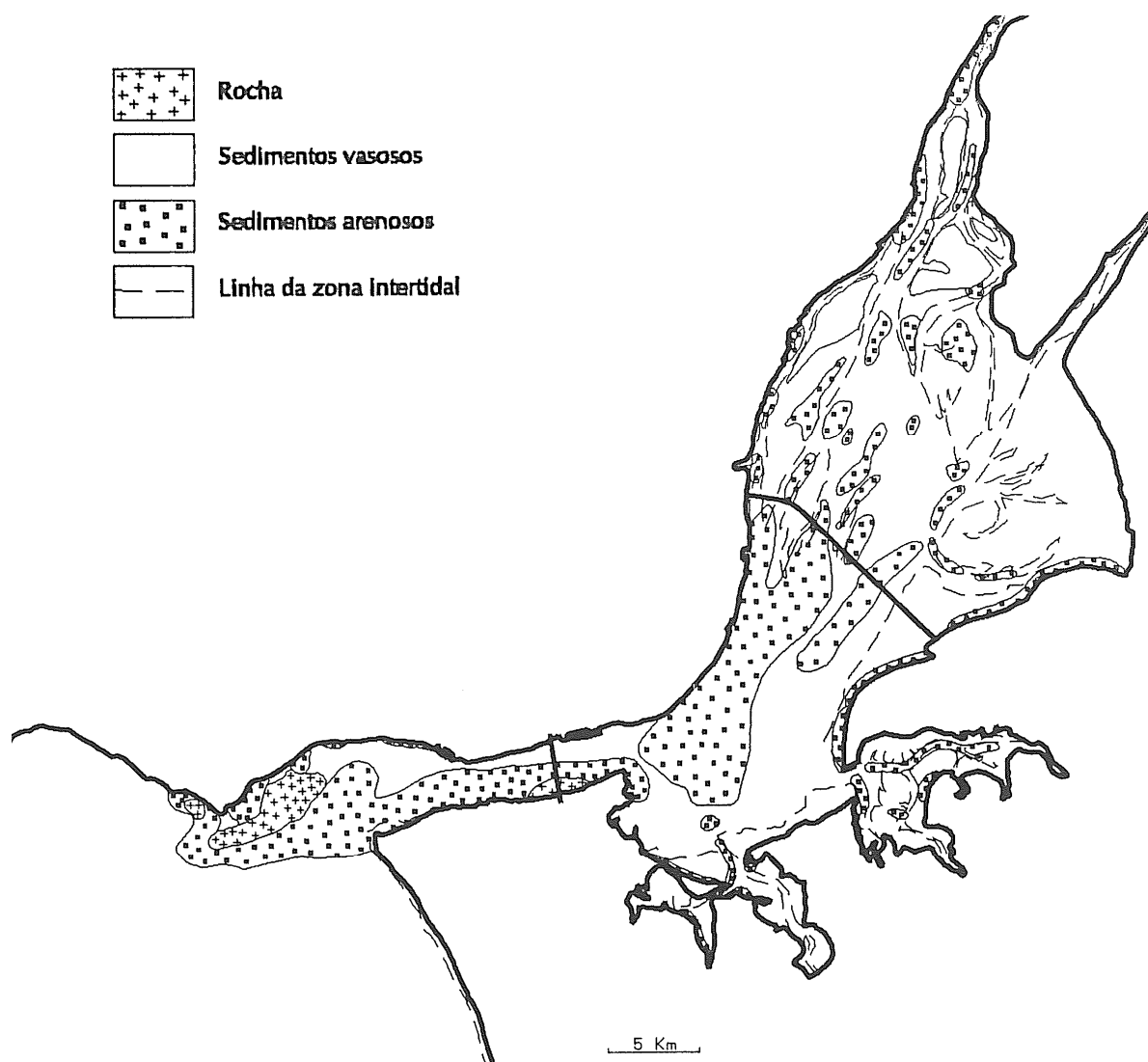


Figura 2.1 - Distribuição dos sedimentos superficiais e morfologia do estuário do Tejo (Freire, 2000).

2.2 Amostragem

Foram seleccionados seis pontos de amostragem que se encontram distribuídos ao longo do estuário do Tejo (Figura 2.2). Estes pontos, ordenados de jusante para montante, têm as seguintes localizações: P1 na praia de Caxias, P2 na praia de Algés, P3 na estação de monitorização do LNEC no cais de Alcântara, junto do local de descarga do efluente tratado da ETAR de Alcântara, P4 na marina do Parque das Nações, P5 em Vila Franca de Xira e P6 em Valada. A Figura I.1, em anexo, apresenta fotografias dos locais de amostragem.



Locais de Amostragem	P1	P2	P3	P4	P5	P6
	Caxias	Algés	Alcântara	Parque das Nações	Vila Franca de Xira	Valada
Coordenadas	38°41'52.6"N 9°16'37.5"W	38°41'41.3"N 9°13'48.0"W	38°41'52.5"N 9°10'31.8"W	38°45'13.5"N 9°05'30.8"W	38°57'14.2"N 8°58'41.5"W	39°05'27.6"N 8°44'46.5"W

Figura 2.2 – Área de estudo. Estuário do Tejo e localização dos locais de amostragem, com as respectivas coordenadas. Fonte da imagem de base: *Google Maps*.

As amostragens processaram-se por via terrestre, condicionante imposta pelos recursos disponíveis, pelo que houve um esforço no sentido de que os pontos de amostragem contivessem proeminências terrestres ou pontões, deste modo evitando áreas mais confinadas e permitindo uma amostragem mais representativa do local. Apesar de não se ter conseguido alcançar a situação ideal dos pontos de amostragem estarem distribuídos pelas duas margens do estuário, os seis pontos de amostragem escolhidos cobrem o estuário desde a zona de maior influência marítima até a zona de montante de maior influência fluvial. Os locais seleccionados também representam zonas onde se espera composições distintas dos sedimentos (Figura 2.1), factor com relevância para os objectivos deste estudo.

Foram realizadas cinco campanhas de campo, nos dias 26 de Outubro, 28 de Novembro e 5 de Dezembro de 2016, e 11 de Janeiro e 27 de Abril de 2017, as quais tiveram objectivos específicos (Tabela 2.1).

As campanhas de 26 de Outubro e 5 de Dezembro de 2016 tiveram carácter exploratório, tendo como finalidades, respectivamente, determinar os parâmetros físico-químicos de qualidade da água a serem medidos e realizar um ensaio piloto numa coluna de sedimentação para determinar a concentração de sedimento e o volume de água de necessários para os ensaios posteriores. Visto tratar-se de uma fase de testes preliminar não se justificava uma análise de toda área em estudo, pelo que foram apenas recolhidas amostras em Algés (P2) e Alcântara (P3).

Os parâmetros físico-químicos definidos para serem medidos *in-situ* no momento da colheita de amostras foram: a temperatura, a condutividade, a salinidade, o pH e o oxigénio dissolvido. Quanto ao ensaio piloto na coluna de sedimentação verificou-se que os ensaios deveriam ser realizados com um volume inicial de cerca de 8 L, bem como, que a concentração inicial de sedimentos em suspensão deveria ser superior a 0,1 g/L, idealmente próximo de 1,5 g/L (Portela et al., 2013).

A campanha realizada no dia 28 de Novembro de 2016 teve como objectivo uma caracterização espacial sintética da área de estudo, de modo a serem definidos com mais rigor os locais onde se realizariam os ensaios detalhados. A primeira amostragem foi realizada em Caxias (P1) às 10h26 e a partir das 14h06 a colheita de amostras para os restantes pontos foi feita de forma sequencial de montante para jusante cobrindo os pontos de amostragem, P2 a P6, com um intervalo aproximado de uma hora entre cada ponto, resultante da deslocação. Em cada ponto de amostragem a primeira tarefa realizada consistiu na medição *in-situ* dos parâmetros ambientais, utilizando duas sondas portáteis multiparamétricas, YSI Professional Plus com sensores de condutividade e temperatura e YSI 556 MPS com sensor de pH (Figura 2.3). Posteriormente efectuou-se a colheita das amostras para análise no laboratório. Foram recolhidas amostras de 1,5 L de água da superfície, com a ajuda de um balde, para garrafas de plástico limpas. Por forma a limitar o efeito de processos biológicos em curso, as amostras foram imediatamente armazenadas numa mala térmica refrigerada e opaca onde permaneceram até à chegada ao laboratório. No laboratório, as amostras foram mantidas em ambiente escuro e refrigerado (câmara frigorífica a 4° C) até serem analisadas.



Figura 2.3 - Sondas portáteis multiparamétricas YSI utilizadas nas campanhas (11 de Janeiro de 2017).

A campanha principal foi realizada a 11 de Janeiro de 2017, na qual se procurou recolher a informação necessária para responder aos objectivos deste estudo. A amostragem realizada nesta campanha teve dois objectivos, nomeadamente, fazer uma caracterização da qualidade da água em duas fases de maré (baixa-mar e preia-mar) e recolher amostras de água para os ensaios na coluna de sedimentação. Nesta etapa do trabalho pretendeu-se que os locais amostrados estivessem na zona de transição do estuário, visto ser a região do estuário onde ocorrem variações mais significativas ao longo do ciclo de maré. Por este motivo excluíram-se os dois pontos mais a montante onde a influência marítima é inexistente (Valada, P6) ou mais reduzida (Vila Franca de Xira, P5) e excluiu-se o ponto mais a jusante, Caxias (P1), neste caso por ter características idênticas (nomeadamente, a variação de

salinidade) ao ponto Algés (P2). Deste modo, as amostragens para esta campanha foram realizadas em três dos seis pontos iniciais, Algés (P2), Alcântara (P3) e Parque das Nações (P4).

Para a caracterização dos parâmetros físico-químicos da água nas duas fases de maré recolheram-se, em cada ponto, duas amostras de água, uma à superfície e outra em profundidade, nos períodos de baixa-mar e preia-mar, totalizando assim 12 amostras. As amostragens em baixa-mar ocorreram entre as 8h05 e as 11h33 e as em preia-mar entre as 14h31 e as 16h36 (Tabela II.1, em anexo). Para a recolha das amostras fez-se uso de uma garrafa de imersão horizontal com capacidade de 2,5 L da General Oceanics (Figura 2.4). Imediatamente antes de cada colheita fez-se o registo dos valores dos parâmetros ambientais, temperatura, condutividade, salinidade, pH e oxigénio dissolvido. Em paralelo com esta amostragem, foi também feita a recolha de amostras de água para os ensaios na coluna de sedimentação. Para tal, em cada ponto foi efectuada uma colheita de cerca de 60 L de água, no período de baixa-mar. Do mesmo modo, para estas colheitas foi também feito o levantamento dos parâmetros físico-químicos da água *in situ*.



Figura 2.4 – Garrafa de imersão horizontal utilizada para a recolha de água nas campanhas de 11 de Janeiro e 27 de Abril de 2017.

A 27 de Abril de 2017, e após a análise preliminar dos resultados obtidos na campanha de 11 de Janeiro de 2017, foi realizada uma última campanha com a finalidade de replicação de alguns testes efectuados para avaliar a agregação de bactérias coliformes fecais (i.e., *E. coli*) ao sedimento. Para tal, recolheram-se amostras de 1,5 L de água em Algés (P2), Alcântara (P3) e Parque das Nações (P4).

Tabela 2.1 – Descrição genérica das campanhas e dados das amplitudes de maré e caudais médios do rio Tejo.

Campanha	Estações amostradas	Tipo/finalidade da campanha	Amplitude da maré, Cascais (m)*	Caudal médio diário, Rio Tejo (m ³ /s)**
26 de Outubro de 2016	P2 e P3	Exploratória	BM: 1,26m, 06:34; PM: 3,07m, 12:48	152
28 de Novembro de 2016	P1 a P6	Caracterização espacial	PM: 3,16m, 13:51; BM: 0,93m, 19:53	95
5 de Dezembro de 2016	P2 e P3	Exploratória	PM: 3,06m, 05:46; BM: 1,18m, 12:02	62
11 de Janeiro de 2017	P2, P3 e P4	Responder aos objectivos	BM: 0,69m, 07:26; PM: 3,42m, 13:38	103
27 de Abril de 2017	P2, P3 e P4	Replicação de testes	BM: 0,41m, 09:51; PM: 3,74m, 16:07	48

* Instituto Hidrográfico (<http://www.hidrografico.pt/previsao-mares.php>); as horas PM – preia-mar; BM – baixa-mar

** Caudal médio diário estimado com base nos dados de níveis da estação de Almourol disponíveis no Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (<http://snirh.pt/>). Apresenta-se em anexo, Figura II.1, a variação do caudal médio diário entre Setembro de 2016 e Abril de 2017.

2.3 Métodos experimentais para caracterização da qualidade da água e sedimentos

2.3.1 Parâmetros físico-químicos

Previamente à realização de análises laboratoriais esperou-se até que as amostras de água atingissem a temperatura ambiente no interior do laboratório, entre 15° e 18°C.

A determinação dos valores de turvação, condutividade e pH, foram as primeiras análises efectuadas em todas as amostras recolhidas. Para o efeito foram utilizados um turbidímetro WTW TURB 555 e um potenciómetro multiparamétrico Consort C863T. Foi também feita a leitura de absorvâncias para as amostras não filtradas em três comprimentos de onda, na gama UV: 280, 300 e 320 nm com recurso a um espectrofluorímetro Horiba Scientific Aqualog. Recorrendo a este último conjunto de dados, calculou-se valores de K_d (m^{-1}) tendo por base a equação apresentada em seguida (Kirk, 1994 in Huoinen et al., 2003):

$$K_d = 2,303 \frac{a}{r} \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde a é a absorvância medida e r é o percurso óptico (m). E calculou-se a profundidade de penetração da radiação solar com base na lei (Huoinen et al., 2003):

$$E_d(z) = E_d(0)e^{-K_d z} \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde $E_d(z)$ ($W\ m^{-2}$) é a radiação à profundidade z (m), $E_d(0)$ ($W\ m^{-2}$) a radiação logo abaixo da superfície e K_d (m^{-1}) é o coeficiente de atenuação vertical para a radiação descendente.

2.3.2 *Escherichia coli*

A determinação da concentração de *E. coli* em cada uma das amostras foi feita pelo método dos tubos múltiplos (Clesceri et al., 1998) utilizando o meio de cultura selectivo Fluorocult (Merck). Para tal, foram dispostos 9 mL de meio de cultura em vários tubos de ensaio com tubo invertido Durhan, de modo a serem realizadas, para cada amostra de água, 5 séries de diluições decimais sucessivas até 10^{-4} . Os tubos de ensaio foram posteriormente sujeitos a um processo de esterilização, durante 15 min a 121 °C numa autoclave Uniclave, ficando deste modo prontos para serem inoculados após arrefecimento. A inoculação do meio com as amostras foi efectuada em condições de assepsia, numa câmara de fluxo laminar Nuaire tipo II. A incubação dos tubos foi feita a 44,5 °C, durante 24 h numa incubadora Ehret BK4106. Após incubação, os tubos com resultado positivo para coliformes fecais, foram submetidos ao teste do indol, que consistiu na adição de algumas gotas do composto no tubo de ensaio e em esperar alguns minutos pela formação de um anel à superfície. Se o anel formado se apresentar incolor o teste tem resultado negativo e em contrapartida se ocorrer formação de um anel de cor vermelha o teste tem resultado positivo (Clesceri et al., 1998).

Foram considerados positivos para a presença de *E. coli* os tubos que apresentassem simultaneamente turvação (crescimento microbiano), mudança de cor do meio de roxo para amarelo, formação de gás nos tubo Durhan e resultado positivo para o teste do indol (Figura 2.6). Por fim fez-se

uma avaliação quantitativa dos microorganismos presentes na amostra através do cálculo do Número Mais Provável (NMP) através de um programa excel disponível em <http://www.wiwiwss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/professoren/wilrich/index.html> (Jarvis et. al, 2010).

2.3.3 Agregação de *E. coli* aos sedimentos

Para avaliar a propensão para agregação entre as bactérias entéricas presentes na coluna de água e os sedimentos em suspensão, e consequente transporte das bactérias agregadas foi elaborado um procedimento adaptado de Jeng et al. (2005). O método foi aplicado a amostras (1 L) provenientes de Algés (P2), Alcântara (P3) e Parque das Nações (P4) (Figura 2.5). Para cada amostra, depois de homogeneizada, foi retirada uma pequena fracção (de 5 a 10 mL) para determinação da concentração de *E. coli* na coluna de água no momento inicial da experiência, t_0 . O restante volume de amostra foi transferido para uma ampola de decantação onde permaneceu por 24 h a 4 °C, de modo a premir a sedimentação das partículas e minimizar o crescimento bacteriano. Findo o período de sedimentação, momento t_1 , fez-se a colheita de uma fracção (de 5 a 10 mL) da amostra no topo da ampola de decantação, bem como de todo o material que se encontrava depositado no fundo, sendo determinado deste último o volume. As três amostras obtidas – t_0 , t_1 na superfície e t_1 no fundo - foram analisadas em simultâneo para determinação de *E. coli* pelo método descrito na secção 2.3.2.



Figura 2.5 – Montagem experimental com ampolas de decantação para testar a agregação e transporte de *E. coli* pelos sedimentos suspensos (da esquerda para a direita, amostras dos pontos P1, P2 e P3, respectivamente) (12 de Janeiro de 2017).

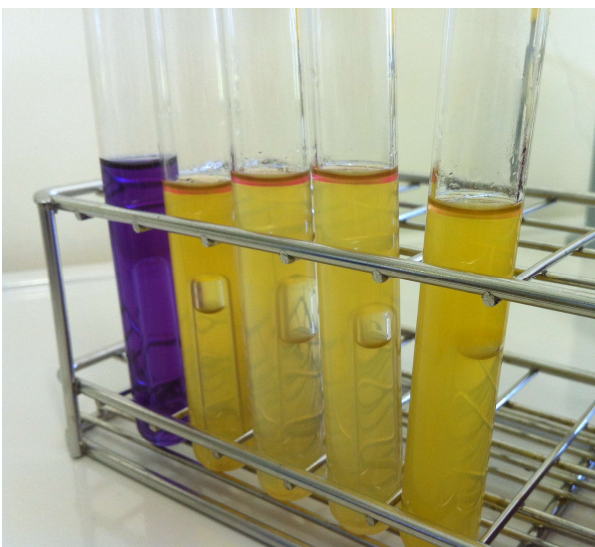


Figura 2.6 – Método dos tubos múltiplos. Tubo de ensaio à esquerda deu resultado negativo e restantes tubos deram resultado positivo para a presença de *E. coli* (16 de Janeiro de 2017).

2.3.4 Determinação de sólidos em suspensão

Para determinar a concentração de sólidos suspensos nas amostras foi utilizado o método gravimétrico de determinação de sólidos suspensos totais, fixos e voláteis (Clesceri et al., 1998). Procedeu-se à lavagem do filtro de fibra de vidro Whatman 934AH, para o que se utilizou três porções sucessivas de 20 mL de água destilada e um dispositivo de filtração por vácuo (Figura 2.7), e seguidamente a calcinação numa mufla LTD a $550 \pm 50^\circ \text{C}$, durante 15 min. Após este período, deixou-

se arrefecer o filtro num exsicador. O filtro foi pesado numa balança analítica com resolução de 0,1 mg, imediatamente antes de ser usado.

A amostra de água depois de bem homogeneizada foi filtrada através do filtro anteriormente preparado e assegurou-se que todo o material suspenso na amostra foi transferido para o filtro através de lavagens dos utensílios em uso com água destilada. Depois de toda a amostra ser filtrada, o filtro permaneceu em vácuo por mais três minutos, de modo a retirar o excesso de água. Posteriormente o filtro foi seco num forno Memmert a 103 – 105 °C por 1 h. Depois de arrefecer no exsicador o filtro foi pesado na balança analítica. O ciclo de secagem no forno, arrefecimento e pesagem do filtro repetiu-se até que a variação de peso fosse inferior a 4 % do peso anterior ou até que fosse de 0,5 mg (o que fosse inferior), isto é, até estabilização do peso.



Figura 2.7 - Dispositivo de filtração por vácuo (26 de Janeiro de 2017).

Nesta fase foi possível calcular a percentagem de sólidos suspensos totais (SST). Para se determinar a percentagem de sólidos suspensos totais fixos e de sólidos suspensos totais voláteis (SSTF e SSTV) prosseguiu-se com a calcinação da amostra (Figura 2.8). O procedimento consistiu na colocação do filtro seco na mufla a 550 ± 50 °C durante 15 min, de seguida deixou-se arrefecer num exsicador e pesou-se. O ciclo de calcinação, arrefecimento e pesagem do filtro repetiu-se até que a variação de peso fosse inferior a 4 % do peso anterior ou até que fosse 0,5 mg (o que fosse inferior), isto é, até estabilização do peso. As percentagens de SSTF e SSTV foram determinados, respectivamente, pela massa de resíduo resultante e perda na calcinação.

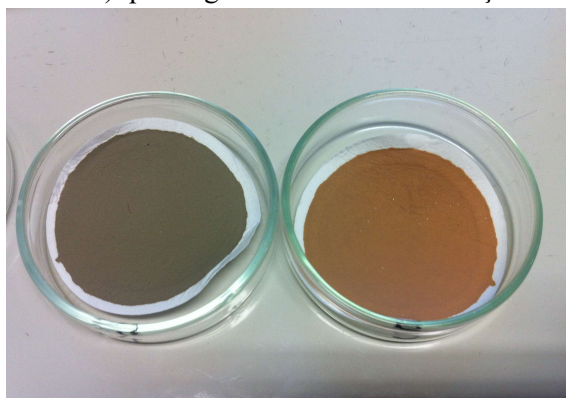


Figura 2.8 - Filtros com sedimento seco (à direita) e calcinado (à esquerda).

As concentrações de SST, SSTF e SSTV foram obtidos através das fórmulas seguintes (Clesceri et al., 1998):

$$SST = \frac{(P_1 - P_0) \times 1000}{V} \quad (\text{Equação 2.3})$$

$$SSTF = \frac{(P_2 - P_0) \times 1000}{V} \quad (\text{Equação 2.4})$$

$$SSTV = \frac{(P_1 - P_2) \times 1000}{V} \quad (\text{Equação 2.5})$$

onde P_0 é o peso do filtro após preparação, P_1 é o peso do filtro com o resíduo seco (mg), P_2 o peso do filtro com o resíduo calcinado (mg) e V é o volume da amostra (mL).

2.3.5 Análise microscópica

Para examinar a morfologia e estrutura dos sedimentos e averiguar a presença de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e de ferro, foram efectuadas diversas observações microscópicas aos sedimentos contidos nas amostras. Para tal foi utilizado um microscópio triocular Olympus BHS com sistema de observação, vídeo e fotografia. O processo de sedimentação do material suspenso, por efeito da gravidade, facilitou a obtenção de amostras mais concentradas para a realização de preparações microscópicas do material em suspensão. Estas foram observadas na sua forma original, tratadas com corante Azul de Alcian para detectar a presença de EPS e com corante Azul de Prússia para detectar a presença de ferro (Poças, 2014). Na coloração com Azul de Alcian a solução corante foi aplicada directamente na preparação e após 5 minutos foram realizadas três lavagens com água destilada. Para a reacção com o Azul de Prússia foi também utilizado o método de coloração por irrigação em que são aplicadas algumas gotas do corante em água destilada a 0,2 % e de seguida gotas do ácido HCl (1 M) (Passow e Alldredge, 1995 in Poças, 2014; Poças, 2014). As observações foram registadas por meio de fotografias através do *software* Cell (Olympus).

2.3.6 Determinação de ferro nos sedimentos

Por forma a confirmar as observações feitas em microscópio para coloração com Azul de Prússia realizou-se uma análise para quantificação do ferro nas amostras. Para a realização desta análise foram necessários três procedimentos sequenciais, nomeadamente, a determinação de sólidos totais da amostra, a dissolução do ferro contido nos sedimentos e a determinação da concentração de ferro pelo método da fenantrolina.

Para a determinação de sólidos totais da amostra foi adoptado o procedimento padronizado para a análise de águas (Clesceri et al., 1998). Colocou-se a amostra bem homogeneizada num cadinho previamente pesado e evaporou-se até à secura em banho-maria (Julabo) (Figura 2.9). Em seguida, o cadinho foi transferido para o forno e repetiu-se o ciclo de secagem, arrefecimento e pesagem até estabilização do peso descrito na secção 2.3.4. Neste estágio é possível calcular a percentagem de sólidos totais contidos na amostra. Para se determinar a percentagem de sólidos fixos e voláteis é necessário prosseguir-se com uma fase de calcinação, sendo eles representados, respectivamente, pelo resíduo resultante e o perdido na calcinação. O procedimento é idêntico ao descrito na secção 2.3.4, tendo sido repetido o ciclo de calcinação, arrefecimento e pesagem até estabilização do peso.

Para a dissolução do ferro maceraram-se as cinzas resultantes da etapa anterior (Figura 2.10) e de seguida foi efectuado um procedimento de digestão ácida, em três fracções (0,01 g, 0,1 g e 1g) de cada amostra (Figura 2.11), com 6 mL de HCl (6 M) durante 1 h a 121 °C na autoclave, em frascos fechados. Visto que após a reacção de digestão foi possível observar partículas não dissolvidas (Figura 2.12) foi realizada uma filtração com filtros de policarbonato 0,20 µm (Poças, 2014).

Por fim, para determinar a concentração de ferro presente na amostra foi realizado o teste da fenantrolina de acordo com o método padronizado para a análise de águas (Clesceri et al., 1998), sendo os resultados obtidos por análise da absorvância a 510 nm com um espectrofotómetro Jasco V-630 (Figura 2.13 e Figura 2.14).



Figura 2.9 – Secagem das amostras em banho-maria.



Figura 2.10 - Maceração da amostra após o processo de calcinação.

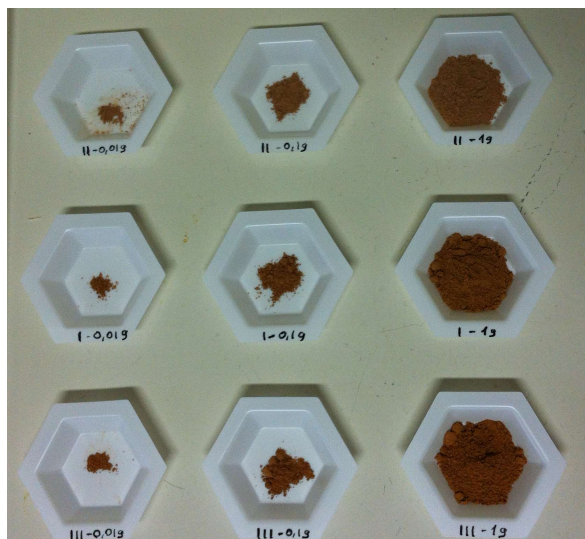


Figura 2.11 - Pesagem de três frações (0,01 g, 0,1 g e 1g) das amostras dos pontos P2, P3 e P4.

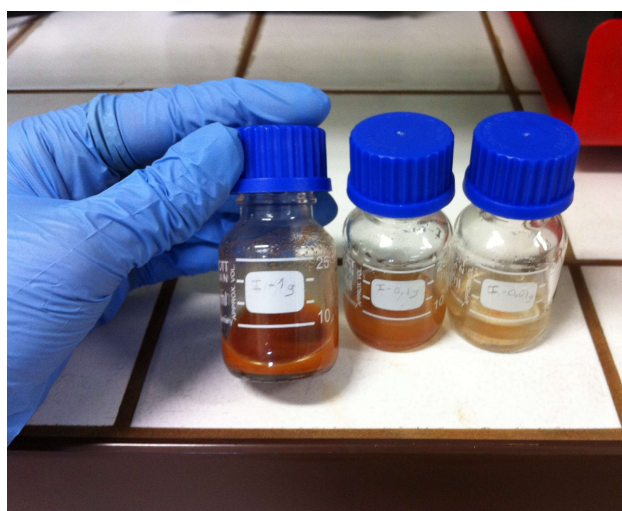


Figura 2.12 – Amostras após a digestão ácida.



Figura 2.13 – Teste da fenantrolina, padrões utilizados para fazer recta de calibração.



Figura 2.14 – Amostras P2, P3 e P4 em três concentrações diferentes em análise pelo método da fenantrolina.

2.4 Coluna de sedimentação

Para a realização dos ensaios na coluna de sedimentação foi necessário obter amostras com uma concentração de sedimentos superior ao que é encontrado em ambiente natural na coluna de água. Deste modo para se obter a concentração necessária foi realizado um procedimento prévio de concentração do sedimento. O mesmo procedimento foi aplicado para os três locais amostrados, como descrito em seguida.

A amostra, cujo volume era de aproximadamente 60 L, foi transferida para um reservatório onde permaneceu por 4 a 7 dias, a uma temperatura de 4 a 8 °C, para promover a sedimentação dos sólidos em suspensão. Após a sedimentação retirou-se o excesso de sobrenadante, por sucção com um sifão, até se obter um volume de cerca de 7 L. Este volume de amostra com o sedimento concentrado foi homogeneizado e transferido para a coluna de sedimentação, tendo-se acrescentado água sobrenadante até perfazer 8 L. Esta amostra transferida para a coluna de ensaio será denominada amostra concentrada e as amostras de água que foram recolhidas no decorrer do ensaio, com um volume máximo de 90 mL, serão designadas por sub-amostras.

A coluna de sedimentação tem uma altura de 2,25 m e um diâmetro interno de 0,11 m, dispondo deste modo de uma capacidade de cerca de 21 L (Figura 2.15). É constituída por vidro acrílico e possui duas aberturas, uma no topo e outra na base permitindo a entrada e saída de líquido, bem como 10 electro-válvulas posicionadas paralelamente que, ascendentemente, se encontram a 0,05 m, 0,15 m, 0,30 m, 0,55 m, 0,80 m, 1,05 m, 1,30 m, 1,55 m, 1,80 m e 2,05 m da base. É possível rodar a coluna em torno de um eixo fixo central o que facilita o processo de homogeneização imediatamente antes do início do ensaio. Os recipientes de colheita para as sub-amostras são dispostos numa estrutura de suporte que efectua um movimento rotativo no decorrer do ensaio e que, tal como a abertura e fecho das electroválvulas, é controlado por um sistema programável, que pode ser operado manual ou automaticamente (Figura I.2 e Figura I.3, em anexo) (Brito, 2008). Nas experiências realizadas neste estudo optou-se por conduzir os ensaios manualmente pois verificou-se ser a forma mais eficaz permitindo maximizar o volume das sub-amostras.

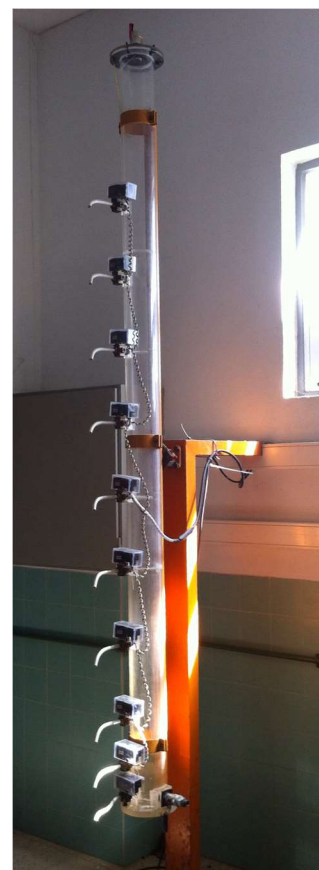


Figura 2.15 - Coluna de sedimentação

As amostras concentradas provenientes de Algés (P2), Alcântara (P3) e Parque das Nações (P4), apresentaram uma concentração de sedimento estimada de 1,5, 0,2 e 1,0 g/L, respectivamente. Os ensaios iniciaram-se com a amostra à temperatura ambiente no interior do laboratório e tiveram uma duração de aproximadamente 5 h. Foram considerados os mesmos intervalos de tempo nos três ensaios, tendo sido recolhidas sub-amostras em 10 instantes de tempo (0, 1, 6, 16, 36, 66, 106, 156, 216, 306 minutos). Visto terem sido utilizados cerca de 8 L de amostra concentrada nos ensaios apenas as 4 electroválvulas inferiores foram contabilizadas nas experiências e as sub-amostras foram recolhidas desses mesmos níveis, em simultâneo para cada instante. Após cada ensaio a coluna foi lavada ficando pronta para a próxima utilização.

Por fim, determinaram-se as concentrações de SSTF e SSTV nas sub-amostras utilizando o método descrito na secção 2.3.4, com o intuito de se obter informação que permita determinar a

velocidade de queda que caracteriza os sedimentos dos pontos de amostragem em estudo. A velocidade média de queda foi calculada de acordo com a seguinte equação (Portela et al., 2013):

$$w_s^n = - \left(\frac{C^{n+1} - C^n}{\Delta t^n} \right) \frac{H^n}{C^n} \quad (\text{Equação 2.6})$$

onde w_s^n (m/s) é a velocidade de sedimentação vertical média no tempo n , C^{n+1} e C^n são as médias das concentrações de sedimento suspenso no momento $n+1$ e n , H^n (m) é a altura da água na coluna após a colheita de amostras no instante n e Δt^n (s) é o intervalo de tempo entre $n+1$ e n .

Obteve-se a velocidade de queda mediana através do cálculo da velocidade correspondente à deposição de 50% em massa da matéria em suspensão no ensaio.

2.5 Análise granulométrica

Com vista à análise granulométrica dos sedimentos contidos nas amostras foi utilizado um analisador de partículas por difracção laser Mastersizer Micro do fabricante Malvern Instruments (Figura 2.16). Este aparelho faz a análise granulométrica de partículas dispersas num líquido, sendo a sua gama de medição de 0,31 a 301 μm (Freire, 2003).

Sabendo qual o meio dispersante e algumas características ópticas do sedimento em análise o equipamento pode calcular o padrão de dispersão previsto que a amostra irá gerar quando o feixe do analisador passar através dele, o que permite a obtenção de um resultado mais exacto. O dispersante utilizado foi água destilada e foi sujeito a uma preparação cuidadosa com vista à não formação de bolhas de ar no decorrer do teste, uma vez que o método de difracção laser é particularmente sensível à presença destas. As características ópticas do sedimento são descritas pela selecção de uma apresentação do “Malvern presentation grid”, tendo-se optado pela apresentação 4OHD (cada carácter da apresentação representa um parâmetro, neste caso particular têm-se as seguintes correspondências: 4 para instrumento Mastersizer Micro, O para Índice de refracção de partícula relativa (real) de 1,15, H para Índice de refracção relativo (imaginário) de 0,1 e D para Índice de refracção do dispersante de 1,33) (Freire, 2003).

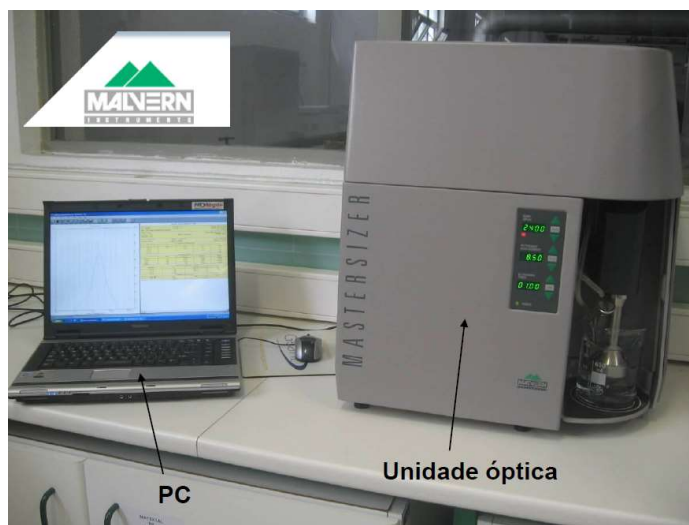


Figura 2.16 – Equipamento usado na análise de difracção laser.

Foram analisadas amostras de água em Algés (P2), Alcântara (P3) e Parque das Nações (P4), com uma concentração de SST superior a 15 g/L cada, após terem atingido a temperatura ambiente no interior do laboratório. Depois da preparação do equipamento, a amostra foi introduzida no copo de amostragem gota a gota sendo a dispersão da amostra garantida por agitação a uma velocidade de 2500

RPM. Assim que se atingiram as condições requeridas pelo equipamento iniciou-se a medição (Freire, 2003).

Foram realizadas três corridas sucessivas de medições para cada amostra de modo a verificar a estabilidade dos resultados (Freire, 2003).

Obteve-se informação relativa ao diâmetro mediano em volume (D_{50}), ao valor para o qual 10 % da distribuição tem um diâmetro inferior (D_{10}) e ao valor para o qual 90% da distribuição tem um diâmetro inferior (D_{90}) (Freire, 2003).

2.6 Análise estatística

O estudo de relações entre diferentes parâmetros foi efectuado através de modelos de regressão linear, tendo todas as análises estatísticas apresentadas sido realizadas usando o *software* Excel (Microsoft).

3. Resultados

3.1 Caracterização da água

3.1.1 Caracterização físico-química e microbiológica da água

De modo a se conseguir uma caracterização geral e mais abrangente a nível espacial da área de estudo realizou-se a campanha de 28 de Novembro, que envolveu medições *in situ* e colheitas de amostras de água em todos os pontos de amostragem (P1 a P6) permitindo a recolha de informação para caracterizar diversos parâmetros ambientais. Na Tabela 3.1 e Tabela 3.2 encontram-se detalhados os resultados obtidos para os parâmetros ambientais analisados. Os resultados referentes à turvação, concentrações de *E. coli*, SST, SSTF e SSTV foram medidos em laboratório. Os restantes valores apresentados correspondem aos parâmetros físico-químicos medidos *in situ* no momento da colheita. O pH e a condutividade específica foram também medidos em laboratório, como descrito na secção 2.3.1, apresentando-se os resultados na Tabela II.2, em anexo.

Tabela 3.1 – Parâmetros de qualidade da água medidos na campanha de 28 de Novembro de 2016. Temp. – temperatura, CE – condutividade específica, OD – oxigénio dissolvido e SST – sólidos suspensos totais.

Ponto de amostragem	Temp. (°C)	CE (µS/cm)	Salinidade (ppt)	OD (mg/l)	pH	Turvação (NTU)	<i>E. coli</i> (NMP/100mL)	SST (g/L)
P1 - Caxias	15,6	38897	30,84	7,53	8,1	6	9,20E+03	0,0106
P2 - Algés	15,8	40100	32,46	7,37	8,0	30	9,20E+03	0,0502
P3 - Alcântara	15,8	35495	27,77	7,06	7,8	28	1,30E+03	0,0372
P4 - P. Nações	15,3	36475	29,02	7,31	7,9	24	7,90E+02	0,0475
P5 - V.F. Xira	13,7	425	0,26	9,22	7,7	19	4,90E+02	0,0262
P6 - Valada	15,1	401	0,24	8,06	7,6	3	3,30E+02	0,0042

Os resultados obtidos mostram uma variação pouco significativa da temperatura ao longo do estuário com excepção do ponto P5 (Vila Franca de Xira). Observa-se também um aumento da salinidade de montante para jusante, como esperado, dado a área de estudo ser um sistema estuarino. Nos pontos de amostragem localizados mais a montante (P5 - Vila Franca de Xira e P6 - Valada) os valores de salinidade são próximos de 0. Ambos os pontos são influenciados pela maré, no entanto, Valada (P6) apresenta tipicamente características fluviais no que se refere à salinidade, com salinidade média de 0,2 (estimada com base em dados do SNIRH medidos entre 1985 e 2017). No que se refere às concentrações de oxigénio dissolvido na água, os valores mais elevados correspondem também aos pontos situados mais a montante, Vila Franca de Xira (P5) e Valada (P6). O valor mais elevado, de 9,22 mg/L, foi medido em Vila Franca de Xira. O pH apresentou pouca variação ao longo do estuário, estando os valores obtidos para os seis pontos amostrados compreendidos na gama de 7,6 a 8,1, sendo os valores ligeiramente mais elevados a jusante. As concentrações de *E. coli* nos pontos de amostragem variaram entre 330 NMP/100 ml e 9200 NMP/100 ml, tendo as concentrações mais elevadas sido observadas na zona de jusante. Note-se que a amostragem em Algés, Alcântara e Parque das Nações (pontos P2 a P4) foi realizada durante a vazante, o que pode sugerir um transporte de *E. coli* de montante para jusante. Em Vila Franca de Xira e Valada (pontos P5 e P6) a amostragem foi realizada,

respectivamente, próxima da preia-mar ou do final da enchente no local. Por fim, relativamente à concentração de SST, verifica-se que esta não atinge valores muito elevados em nenhum dos pontos amostrados, notando-se uma redução mais significativa em Valada (P6).

A análise laboratorial das amostras compreendeu ainda a determinação das concentrações de SSTF e SSTV (Tabela 3.2). Verifica-se que em todas as amostras a percentagem de SSTF é superior à de SSTV. Os valores mais elevados de SSTF foram observados em Algés, Alcântara e no Parque das Nações (pontos P2, P3 e P4), o que indica um teor mais elevado de matéria inorgânica nos SST nestes locais. O ponto mais a montante, Valada (P6), apresentou a maior percentagem de SSTV face aos restantes pontos de amostragem, ou seja, um maior teor em matéria orgânica nos sedimentos em suspensão. Com excepção do ponto mais a jusante (Caxias, P1), parece existir uma diminuição do teor de matéria orgânica nos sedimentos em suspensão de montante para jusante. Esta observação pode em parte ser explicada pela entrada de matéria orgânica na zona mais a montante do sistema, que vai sendo transportada ao longo do mesmo à medida que é utilizada pelas comunidades biológicas aí inseridas

Tabela 3.2 – Concentração e respectiva percentagem de SSTF e SSTV das amostras recolhidas na campanha de 28 de Novembro.

Ponto de amostragem	SSTF (g/L)	% SSTF	SSTV (g/L)	%SSTV
P1 - Caxias	0,0084	79,2	0,0022	20,8
P2 - Algés	0,0450	89,6	0,0052	10,4
P3 - Alcântara	0,0332	89,2	0,0040	10,8
P4 - P. Nações	0,0409	86,1	0,0066	13,9
P5 - V.F. Xira	0,0225	85,9	0,0037	14,1
P6 - Valada	0,0031	73,8	0,0011	26,2

Dado que a amostragem realizada para a caracterização do local de estudo foi exploratória e consistiu numa única amostragem em cada ponto, não foi possível cobrir a variabilidade dos vários factores que controlam a dinâmica no estuário do Tejo, como a maré, variabilidade climática sazonal ou o caudal fluvial.

Tal como mencionado anteriormente, após a análise dos resultados desta campanha foram escolhidos os pontos de amostragem P2, P3 e P4 (Algés, Alcântara e Parque das Nações) para a execução das etapas seguintes do trabalho. A escolha destes pontos foi justificada pela sua localização na zona intermédia do estuário, onde existe uma influência significativa da maré. Adicionalmente são também zonas influenciadas por descargas de efluentes urbanos, nomeadamente no caso do ponto P2 a descarga do efluente da ETAR de Alcântara.

De seguida são apresentados os resultados obtidos na campanha de 11 de Janeiro, onde se procurou fazer uma caracterização dos parâmetros físico-químicos e microbiológico em duas fases de maré (Tabela 3.3), sendo as amostras recolhidas o mais próximo possível da baixa-mar e da preia-mar (Tabela II.1, em anexo). São também apresentados os resultados das concentrações e respectivas percentagens de SSTF e SSTV em cada uma das amostras recolhidas nesta campanha (Tabela 3.4). Para cada instante de amostragem foram realizadas duas colheitas, uma à superfície e outra próxima do fundo. Dadas as diferenças de profundidade existentes entre os três pontos de amostragem (Algés, Alcântara e Parque das Nações), a amostra de fundo foi efectuada a diferentes profundidades. É de notar que a

amostra de fundo em preia-mar para o ponto de amostragem Parque das Nações foi feita a alguns metros de distância do ponto, na zona mais interior da marina, devido a dificuldades no acesso ao local.

Tabela 3.3 - Parâmetros de qualidade da água medidos na campanha de 11 de Janeiro de 2017. Temp. – temperatura, CE – condutividade específica, Sal. – salinidade e Turv. – turvação.

	Maré	Profundidade (m)*	Temp (°C)	CE (μS/cm)	Sal. (ppt)	pH	Turv. (NTU)	<i>E. coli</i> (NMP/100mL)	SST (g/L)
Algés	Preia-mar	Superfície (0,15)	15,5	41750	33,50	8,6	10	1,70E+03	0,0186
		Fundo (3,5)	15,5	42578	34,21	8,7	10	4,90E+02	0,0206
	Baixa-mar	Superfície (0,15)	14,6	38678	31,45	8,8	85	1,10E+05	0,1953
		Fundo (1,5)	14,6	35920	29,06	8,9	100	1,60E+05	0,3600
Alcântara	Preia-mar	Superfície (0,15)	15,3	42095	34,09	8,6	13	7,90E+02	0,0218
		Fundo (9)	15,4	42660	34,45	8,6	21	7,80E+01	0,0350
	Baixa-mar	Superfície (0,15)	13,7	35295	29,14	8,6	14	3,50E+04	0,0318
		Fundo (6)	13,8	36260	29,91	8,6	9	5,40E+03	0,0343
Parque das Nações	Preia-mar	Superfície (0,15)	14,4	37553	30,62	8,6	23	7,80E+01	0,0338
		Fundo (4,5)	14,0	35394	29,02	8,6	60	7,90E+02	0,0876
	Baixa-mar	Superfície (0,15)	13,6	33682	27,73	8,7	49	1,40E+03	0,0760
		Fundo (1)	13,5	33914	28,00	8,6	46	7,00E+02	0,1053

*Distância (m) até à superfície.

Na Tabela 3.3 vemos que os resultados referentes à condutividade específica variaram entre os 33682 μS/cm e os 42660 μS/cm, correspondendo os valores mais baixos às amostras recolhidas no Parque das Nações. Os valores referentes à salinidade variaram entre cerca de 28 ppt e 35 ppt. A turvação apresenta valores baixos para as amostragens de Algés e Alcântara em preia-mar, entre os 10 NTU e os 21 NTU, e valores elevados nas amostras de Algés recolhidas em baixa-mar, com 85 NTU à superfície e 100 NTU junto ao fundo. As concentrações mais elevadas de *E. coli* foram observadas nas amostras de Algés em baixa-mar com, 1,60E+05 NMP/100mL à superfície e 1,60E+05 NMP/100mL, a concentração mais baixa obtida foi de 7,80E+01 NMP/100mL tanto para Alcântara em preia-mar perto do fundo como para o Parque das Nações em preia-mar à superfície. Os SST variaram entre os 0,36 g/L e os 0,0186 g/L, sendo as concentrações mais altas observadas nas amostras de Algés em baixa-mar. Genericamente observa-se que os valores da turvação, da concentração de *E. coli* e da concentração de SST são mais elevadas nos períodos de baixa-mar do que nos períodos de preia-mar, variando de forma inversa à salinidade. O pH apresenta-se, mais uma vez, constante tanto para as duas fases de maré, como também para as duas profundidades amostradas nos três pontos de amostragem, sendo de aproximadamente 9 em todas as amostras. Ao se comparar as amostras recolhidas à superfície com as recolhidas em profundidade são notórias diferenças para os valores referentes à concentração de *E. coli*

que apresenta concentrações mais elevadas à superfície (com excepção da amostra de preia-mar para o Parque das Nações, onde as amostras não foram colhidas exactamente no mesmo local para as duas profundidades), bem como para os valores de SST que mostram maior concentração nas amostras recolhidas junto ao fundo. Quanto à constatação anterior a diferença de concentração de *E. coli* entre as amostragens realizadas em Algés e no Parque das Nações em baixa-mar é desprezável devido ao erro associado ao método utilizado, e que possivelmente advém das amostras do fundo terem sido colhidas relativamente próximas das de superfície, para ambos os casos.

Relativamente às concentrações de SSTF e SSTV verifica-se a existência de uma maior percentagem de SSTF do que SSTV para os três pontos de amostragem (Tabela 3.4), tal como observado nos resultados da campanha de 28 de Novembro (Tabela 3.2). Também para os três pontos, nas colheitas de preia-mar, observa-se uma percentagem ligeiramente superior de SSTF (i.e., matéria inorgânica) no fundo do que na superfície. Contudo, nas colheitas de baixa-mar sucede o inverso, ou seja, existe uma tendência para a percentagem de SSTF ser superior nas amostras da superfície. Estas relações observadas podem ter estar associadas aos diversos mecanismos de floculação, agregação, desagregação, erosão e deposição associados ao transporte de sedimentos dentro do sistema aquático.

Tabela 3.4 – Concentração e respectiva percentagem de SSTF e V das amostras recolhidas na campanha de 11 de Janeiro.

	Maré	Profundidade (m) *	SSTF (g/L)	% SSTF	SSTV (g/L)	% SSTV
Algés	Preia-mar	Superfície (0,15)	0,0158	84,9	0,0028	15,1
		Fundo (3,5)	0,0182	88,3	0,0024	11,7
	Baixa-mar	Superfície (0,15) **	0,1805	92,4	0,0148	7,6
		Fundo (1,5)	0,3303	91,8	0,0297	8,3
Alcântara	Preia-mar	Superfície (0,15)	0,0186	85,3	0,0032	14,7
		Fundo (9)	0,0312	89,1	0,0038	10,9
	Baixa-mar	Superfície (0,15) **	0,0275	86,5	0,0043	13,5
		Fundo (6)	0,0275	80,1	0,0068	19,7
Parque das Nações	Preia-mar	Superfície (0,15)	0,0300	88,8	0,0038	11,1
		Fundo (4,5)	0,0784	89,5	0,0092	10,5
	Baixa-mar	Superfície (0,15) **	0,0688	90,5	0,0072	9,5
		Fundo (1)	0,0900	85,5	0,0153	14,5

*Distância (m) até à superfície. **Colheita de água para os ensaios na coluna de sedimentação.

No decorrer desta campanha realizou-se a colheita de água para a realização dos ensaios na coluna de sedimentação no período de baixa-mar visto ser o período em que a concentração de SST na coluna de água é mais elevada, tal como se pode observar pelos valores de SST (Tabela 3.3). Esta opção permitiu minimizar o volume de água recolhido, para posterior concentração dos sedimentos em suspensão (secção 2.4).

3.1.2 Exploração de relações entre parâmetros físico-químicos e microbiológicos

Procurou-se ainda a existência de relações entre alguns dos parâmetros medidos, os resultados sugerem a existência de relações entre a concentração de *E. coli* e a concentração de SST na coluna de água (Figura 3.1) bem como de relação entre a concentração SST e a turvação (Figura 3.2). Nos dois casos as rectas de tendência apresentavam um elevado coeficiente de determinação, $R^2 = 0,85$. Foi também observada a relação entre os mesmos parâmetros, mas considerando os dados de todas as campanhas efectuadas, e o resultado aponta novamente para a existência de relação para ambos os casos (Figura 3.3 e Figura 3.4).

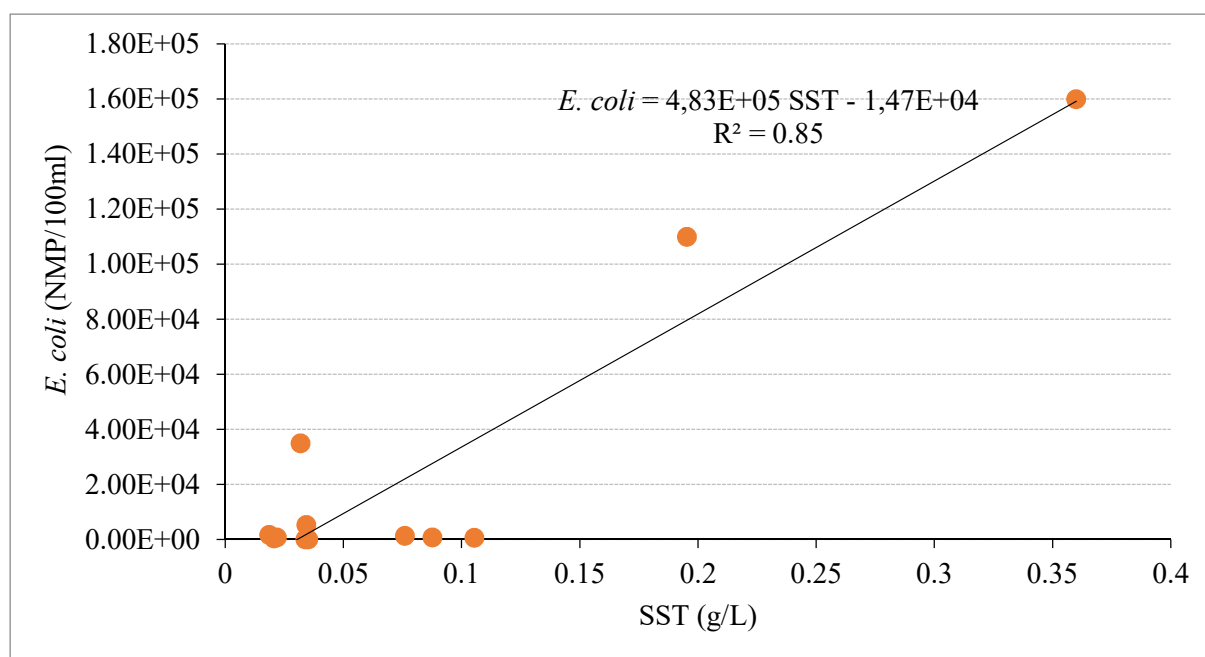


Figura 3.1 – Relação entre concentração de *E. coli* e de sedimentos em suspensão para a amostragem de 11 de Janeiro.

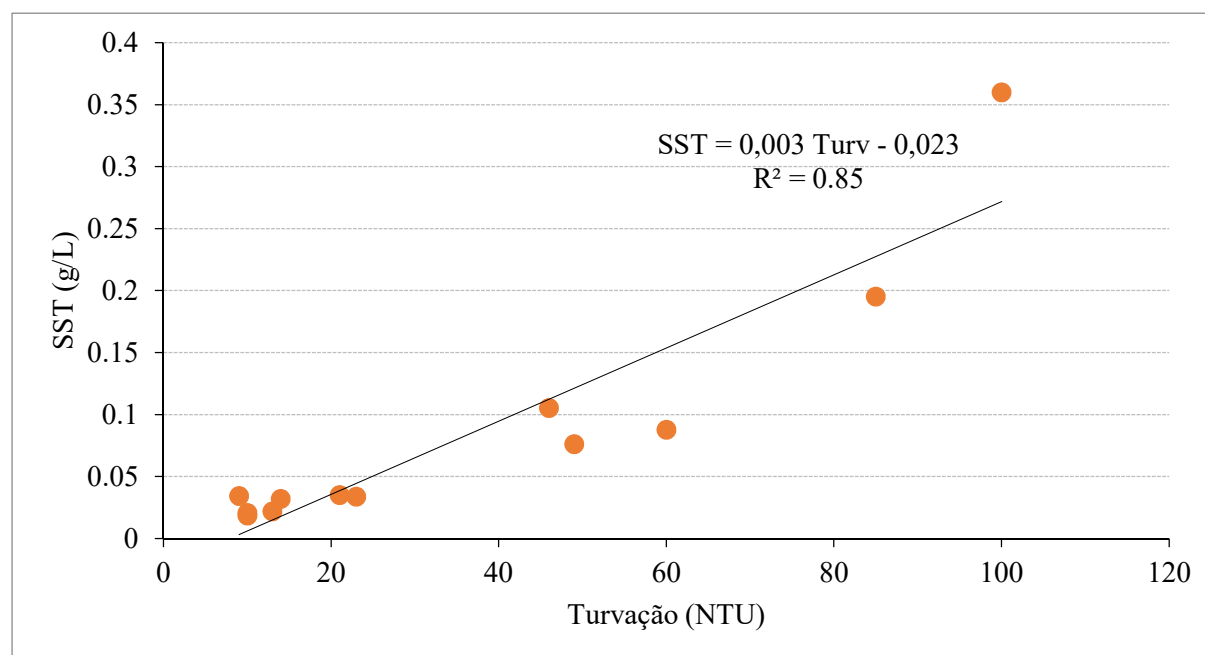


Figura 3.2 - Relação entre a concentração de sedimentos em suspensão e a turvação para a amostragem de 11 de Janeiro.

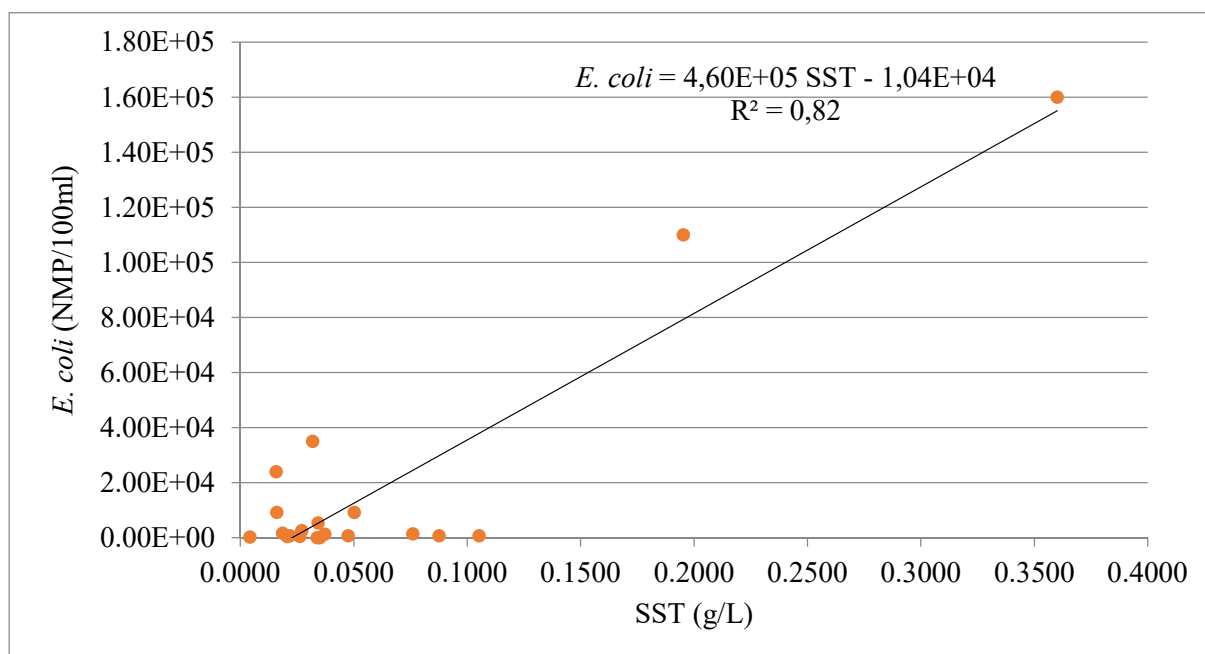


Figura 3.3 - Relação entre concentração de *E. coli* e de sedimentos em suspensão, considerando os dados de todas as campanhas.

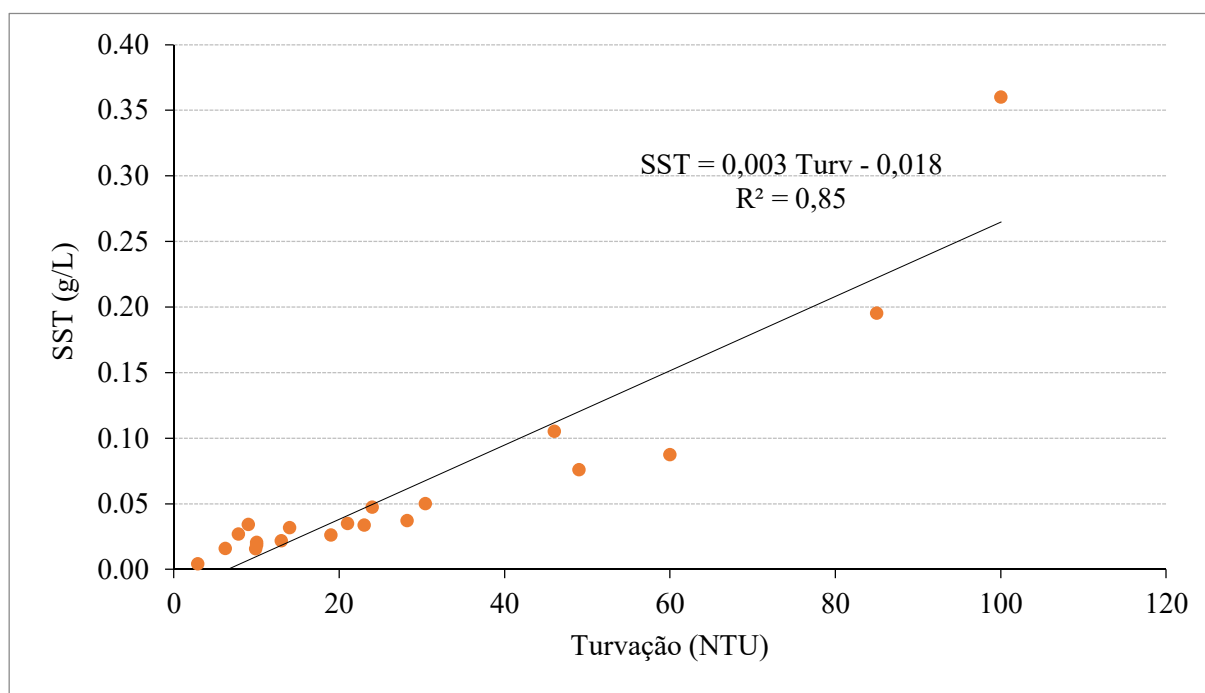


Figura 3.4 - Relação entre a concentração de sedimentos em suspensão e a turbidez, considerando os dados de todas as campanhas.

Para a relação entre a concentração de *E. coli* e a concentração de SST, foi ainda feita uma análise por ponto de amostragem. Apenas foi encontrada uma tendência de relação no caso de Algés (Figura 3.5). Para os resultados correspondentes a Alcântara e ao Parque das Nações, em ambos os parâmetros, concentração de *E. coli* e concentração de SST, os valores obtidos foram sempre de baixas concentrações. Contrariamente, nos dados referentes a Algés observa-se a existência de alguns valores de

concentrações elevadas, podendo ser esse o factor que contribuiu para a relação. Os resultados sugerem que as relações entre estes dois parâmetros, concentração de *E. coli* e concentração SST, são tanto mais fiáveis quanto maior a concentração em que se encontram no meio.

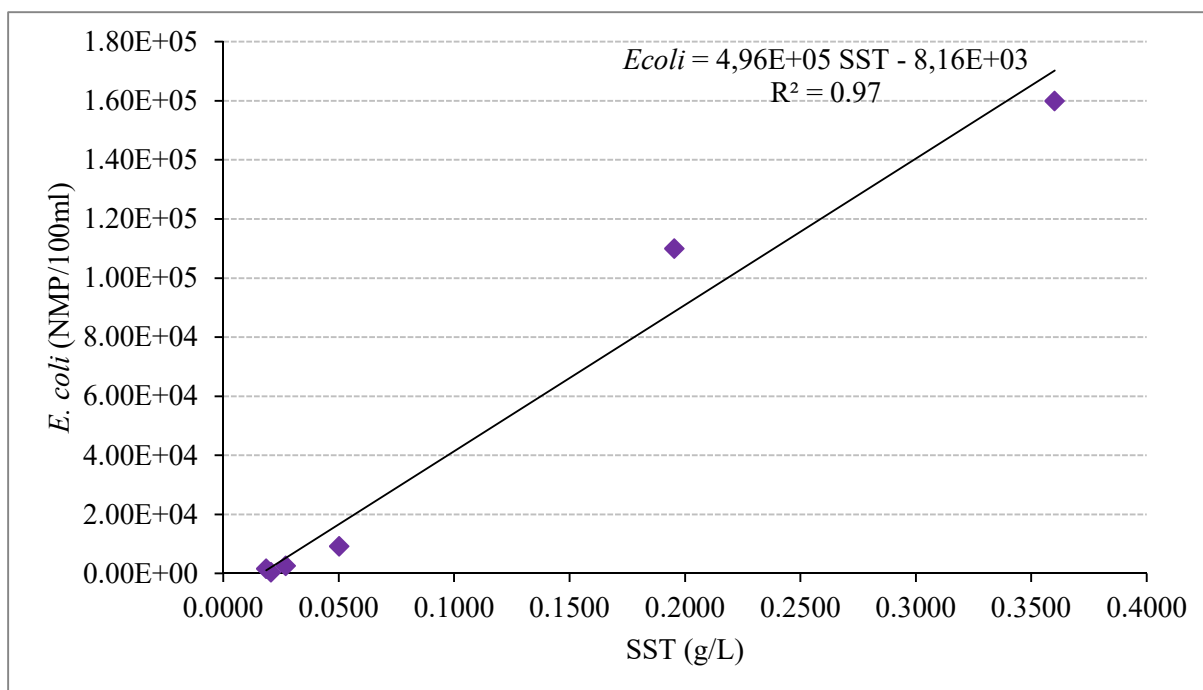


Figura 3.5 - Relação entre a concentração de *E. coli* e de sedimentos em suspensão para as amostragens no ponto P2, Algés.

3.1.3 Extinção da radiação UV-B na coluna de água

Uma outra análise efectuada às amostras recolhidas na campanha de 11 de Janeiro foi a determinação da penetração de radiação solar na água. Visto que, como mencionado anteriormente, a radiação com maior efeito bactericida é a radiação ultravioleta na gama UV-B (280 – 320 nm), foi analisada a atenuação da radiação em três comprimentos de onda dentro desta gama, 280 nm, 300 nm e 320 nm.

Apresentam-se na Tabela 3.5 os coeficientes de atenuação obtidos, com base na (Equação 2.1). Os valores de absorvância medidos são apresentados na Tabela II.4, em anexo.

Tabela 3.5 - Valores do coeficiente de atenuação vertical obtidos para as amostras da campanha de 11 de Janeiro.

Ponto de amostragem	Maré	Profundidade	$K_d(m^{-1})$		
			280 nm	300 nm	320 nm
Algés	Preia-mar	Superfície	0,00079	0,00067	0,00032
		Fundo	0,00076	0,00065	0,00040
	Baixa-mar	Superfície	0,00358	0,00325	0,00040
		Fundo	0,00420	0,00387	0,00040
Alcântara	Preia-mar	Superfície	0,00090	0,00079	0,00049
		Fundo	0,00120	0,00108	0,00033
	Baixa-mar	Superfície	0,00171	0,00137	0,00123
		Fundo	0,00127	0,00098	0,00077
Parque das Nações	Preia-mar	Superfície	0,00170	0,00147	0,00070
		Fundo	0,00386	0,00344	0,00064
	Baixa-mar	Superfície	0,00293	0,00257	0,00096
		Fundo	0,00305	0,00266	0,00091

Com base nos coeficientes de atenuação determinados através das absorvâncias medidas para as diferentes amostras, determinaram-se as profundidades de extinção de 90 % da radiação para as amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações, com base na(Equação 2.2. Seguem-se os resultados obtidos (Figura 3.6).

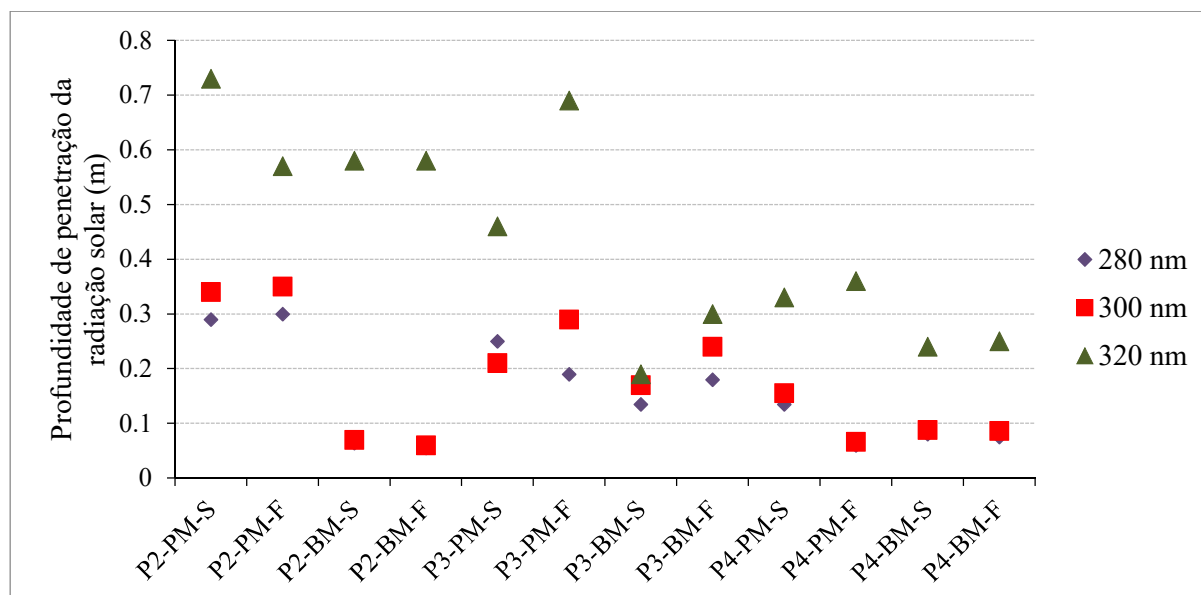


Figura 3.6 - Profundidade de extinção de 90% da radiação UV incidente em Algés (P2), Alcântara (P3) e Parque das Nações (P4). PM - preia-mar, BM - baixa-mar, S - superfície, F – fundo.

De acordo com os resultados obtidos, dos três comprimentos de onda analisados, a radiação de 320 nm é a que alcança maiores profundidades, em todas as situações analisadas (i. e., nos três pontos de amostragem e nas duas fases de maré). Por outro lado, as radiações nos comprimentos de onda de

300 nm e nos 280 nm não atingem profundidades tão elevadas e têm um comportamento muito similar entre si.

Para uma extinção de 90 % da radiação incidente as profundidades máximas atingidas são de cerca de 0,3, 0,35 e 0,73 metros para as radiações de 280 nm, 300 nm e 320 nm, respectivamente. Estas profundidades correspondem às amostras colhidas em preia-mar para Algés, onde os SST se encontravam em concentrações mais baixas. Do mesmo modo, nas amostras onde as concentrações de SST são mais elevadas a penetração da radiação diminui (Figura 3.7). Na Figura 3.7 pode-se observar a relação inversa entre a penetração da radiação e a concentração de SST, especialmente evidente para as radiações com comprimentos de onda de 300 nm e 280 nm. Para a penetração da radiação a 320 nm a concentração de SST parece não ter uma influência tão significativa.

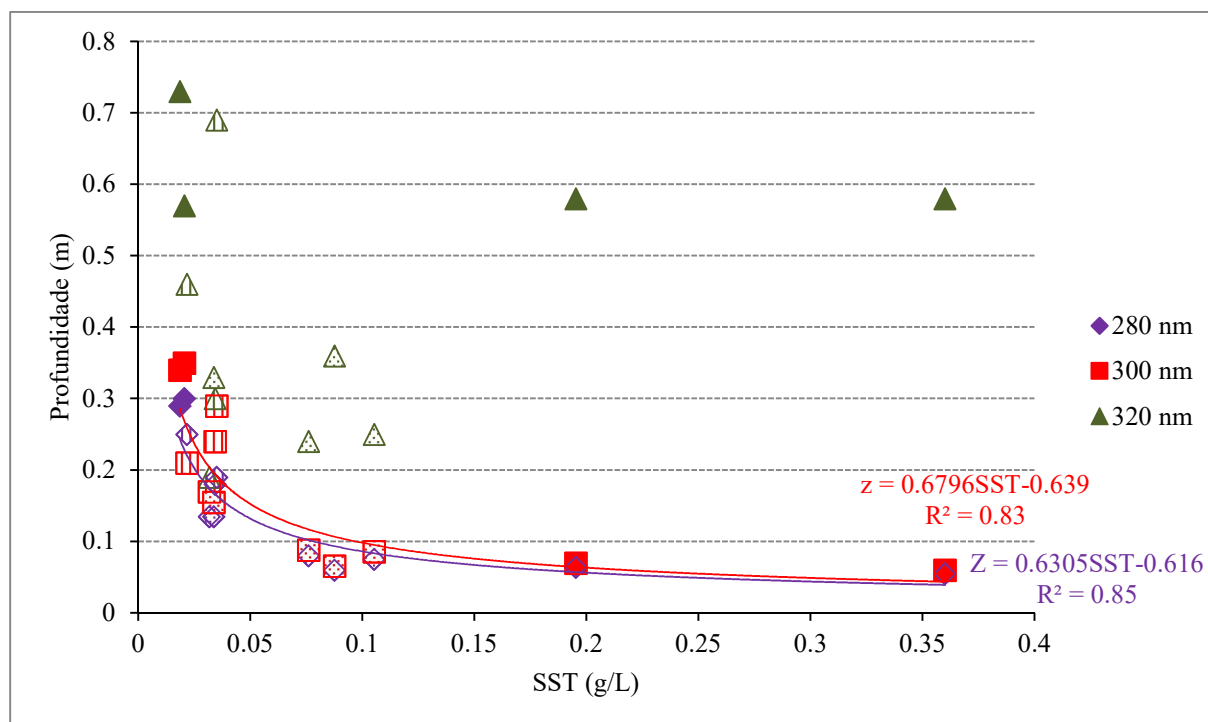


Figura 3.7 – Relação entre a concentração de SST e a profundidade de extinção de 90 % da radiação UV. Símbolos a cheio – Algés, símbolos com linhas – Alcântara, símbolos com pontos - Parque das Nações.

Para a atenuação da radiação UV contribui também a matéria orgânica dissolvida, em particular os ácidos húmicos e fúlvicos que são os componentes principais da matéria orgânica natural em águas superficiais. Embora não considerados nesta tese, o teor e o tipo de matéria orgânica presentes na coluna de água são um factor importante a considerar na atenuação da radiação.

3.2 Caracterização dos sedimentos em suspensão

3.2.1 Análise microscópica

A primeira análise feita aos sedimentos contidos nas amostras foi a observação microscópica. Com esta análise pretendeu-se conhecer as principais características morfológicas de cada tipo de sedimento tendo sido feita a observação do material fresco, na água amostrada, e de seguida com aplicação de dois corantes, Azul de Alcian e Azul de Prússia. Para cada amostra foram tiradas diversas fotografias das imagens microscópicas sendo em seguida apresentadas aquelas que representam os principais padrões observados (Figura 3.8).

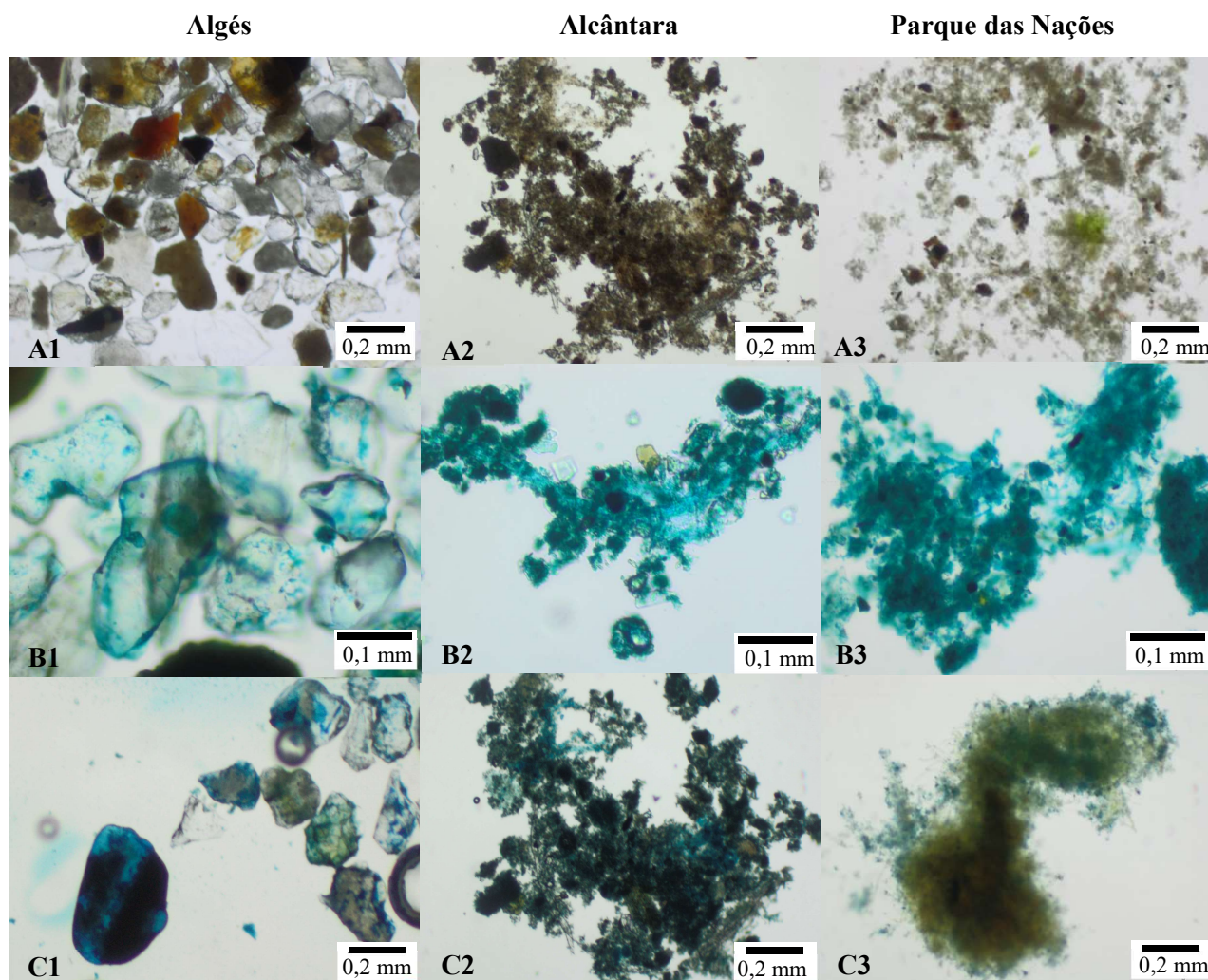


Figura 3.8 - Fotos microscópicas do sedimento contido nas amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações (P2, P3 e P4). A1, A2 e A3 – material fresco, B1, B2 e B3 - coloração com Azul de Alcian; C1, C2 e C3 - coloração com azul de Prússia.

A observação microscópica dos sedimentos contidos nas amostras de água revelou diferenças quanto ao tamanho e agregação das partículas, sendo a amostra de Algés a mais distinta por exibir partículas de maiores dimensões e aparentemente individualizadas. Contrariamente, os sedimentos provenientes de Alcântara e do Parque das Nações para além de serem mais finos, exibem a formação de agregados (Figura 3.8). Nas fotos B1 a C3 da Figura 3.8 podemos observar os resultados da coloração com Azul de Alcian e Azul de Prússia para os sedimentos dos três pontos de amostragem em análise. O corante Azul de Alcian revela a presença de EPS, substâncias poliméricas extracelulares produzidos por alguns fungos e bactérias que são excretados para o meio e que têm reconhecidamente propriedades

adsorventes/ligantes e flocculantes (More et al., 2014) favorecendo a agregação de bactérias e a formação de flocos. Os resultados mostram a presença de EPS para todos os tipos de sedimento, destacando-se uma maior percentagem de sedimento corado para as amostras de Alcântara e Parque das Nações, correspondendo às amostras onde também ocorre a formação de agregados. O Azul de Prússia indica a presença de ferro apenas nas zonas onde cora de azul com tonalidade mais intensa (Poças, 2014). Deste modo, temos presença de ferro na amostra de Algés, e nas amostras provenientes de Alcântara e do Parque das Nações o teste deu resultado inconclusivo.

Recordando os dados referentes aos teores dos SSTV nos sedimentos, apresentados na Tabela 3.4, temos os valores de 8 %, 14 % e 9 % para as amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações, respectivamente. As percentagens relativas de SSTV, ou seja, de matéria inorgânica, para os três pontos parecem relacionar-se com os resultados obtidos na coloração com Azul de Alcian, na medida em que na amostra com maior percentagem de matéria orgânica há uma também grande porção de sedimento corado e na amostra com menor percentagem de matéria orgânica há uma menor porção de sedimento corado.

De modo a se confirmar as observações feitas na coloração com Azul da Prússia, realizou-se ainda a análise de ferro pelo método da fenantrolina. Após uma duplicação do teste, os resultados obtidos foram: 24118,2 $\mu\text{gF/g}$ de sedimento para Algés, 0 $\mu\text{gF/g}$ de sedimento para Alcântara e 16,8 $\mu\text{gF/g}$ de sedimento para o Parque das Nações. Com esta análise comprovou-se a existência de ferro na amostra de Algés e demonstrando que existem diferenças quanto à composição do sedimento das amostras de Alcântara e do Parque das Nações, existindo na última uma pequena quantidade de ferro.

3.2.2 Análise granulométrica

Por forma a caracterizar a dimensão dos sedimentos presentes nas amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações (P2, P3 e P4) e complementando as observações microscópicas realizadas, foi feita uma análise por difracção laser. Os resultados obtidos relativos à distribuição granulométrica dos sedimentos são apresentados na Figura 3.9.

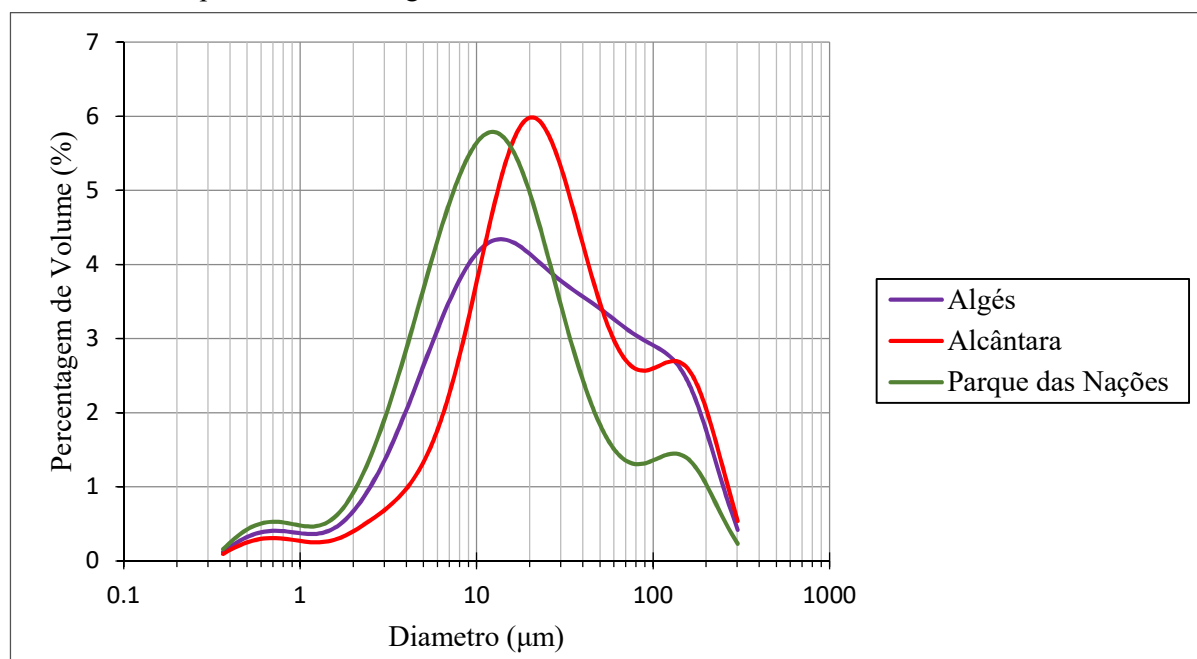


Figura 3.9 - Distribuição granulométrica dos sedimentos em suspensão de Algés, Alcântara e Parque das Nações, P2, P3 e P4.

Obtiveram-se os diâmetros D_{10} , D_{50} e D_{90} de 4 μm , 19 μm e 118 μm para a amostra de Algés, de 6 μm , 23 μm e 126 μm para a amostra de Alcântara e de 3 μm , 12 μm e 73 μm para a amostra do Parque das Nações, respectivamente. Na Figura 3.9 verifica-se ainda que para as amostras de Alcântara e do Parque das Nações existe um declive muito mais acentuado após o pico máximo quando comparado com a curva de Algés, isto significa que para os dois primeiros pontos existe um maior volume de sedimentos mais finos nas amostras, enquanto que, para os sedimentos provenientes de Algés, as dimensões dos sedimentos variam dentro de uma gama mais ampla, abrangendo valores de diâmetros mais elevados. É ainda importante salientar que, devido ao limite do aparelho na gama de medições e relacionando com as observações microscópicas feitas para a amostra de sedimentos de Algés, verifica-se que os resultados da análise granulométrica para este ponto de amostragem não compreendem a total distribuição de tamanhos das partículas constituintes do sedimento, existindo partículas de maiores dimensões não incluídas na leitura.

Para as amostras Alcântara e do Parque das Nações pode-se constatar a existência de um segundo pico, em ambos os casos para um diâmetro aproximado de 150 μm , contudo em cada uma das amostras este pico corresponde a uma percentagem diferente de sedimento, sendo na amostra de Alcântara representativo de uma maior porção do sedimento amostrado. Assim sendo, a amostra do Parque das Nações corresponde ao sedimento mais fino pois a maioria das partículas que o constituem não ultrapassam os 73 μm ($D_{90} = 73 \mu\text{m}$), segue-se a amostra de Alcântara que também tem uma grande porção de partículas de pequenas dimensões ($D_{50} = 23 \mu\text{m}$) mas já incorpora uma percentagem de partículas de maiores dimensões ($D_{90} = 126 \mu\text{m}$) e por fim, a amostra de Algés é a que contem os sedimentos de maiores dimensões (Figura 3.8).

Note-se ainda que o processamento efectuado pelo analisador de tamanho de partículas provoca a quebra das ligações estabelecidas no processo de agregação, que se verificou existir para as amostras dos pontos P3 e P4. Por este motivo os resultados apresentados referem-se apenas ao tamanho das partículas que constituem as diferentes amostras de sedimento e não à dimensão dos agregados observados na análise microscópica.

3.2.3 Agregação de *E. coli* aos sedimentos em suspensão

A análise de agregação de *E. coli* aos sedimentos em suspensão baseou-se na comparação das concentrações de bactérias à superfície e no fundo da amostra após um período de sedimentação, t_1 superfície e t_1 fundo, respectivamente (secção 2.3.3). Caso se observem diferenças para estes valores fundamenta-se que ocorreu deslocação de microorganismos associados ao sedimento.

Este ensaio foi efectuado com amostras colhidas a 11 de Janeiro e a 27 de Abril, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.6. As diferenças nas concentrações de *E. coli* foram consideradas significativas ($p = 0.05$, com base no teste de t de Student) apenas quando a respectiva razão era inferior a 0.29.

Tabela 3.6 – Teste da agregação de *E. coli* ao sedimento. Valor de NMP/100 mL para Algés, Alcântara e Parque das Nações (pontos P2, P3 e P4). Resultados das campanhas de 11 de Janeiro e de 27 de Abril. t_0 - momento inicial da experiência e t_1 – 24h após o início da experiência.

Algés			
Campanha	t_0	t_1	
		Superfície	Fundo
11 Jan	9,40E+02	3,80E+03	3,80E+03
27 Abr	5,40E+05	2,40E+05	5,40E+05
Alcântara			
Campanha	t_0	t_1	
		Superfície	Fundo
11 Jan	2,20E+04	7,00E+04	1,10E+05
27 Abr	3,50E+05	4,90E+04	1,60E+06
Parque das Nações			
Campanha	t_0	t_1	
		Superfície	Fundo
11 Jan	5,50E+02	3,60E+02	3,80E+03
27 Abr	4,60E+02	2,20E+02	9,20E+03

Os resultados obtidos são idênticos para as duas análises efectuadas, sugerindo que não existe ou que é reduzida a agregação das bactérias aos sedimentos em suspensão nas amostras de Algés, P2, e que existe agregação nas amostras de Alcântara e do Parque das Nações. Para as amostras de Algés, a da campanha de 11 de Janeiro não revelou diferenças entre as concentrações de *E. coli* no instante t_1 , e a da campanha de 27 de Abril revelou uma diferença de 2,40E+05 NMP/100 mL à superfície para 5,40E+05 NMP/100 mL no fundo. A análise realizada para a amostra colhida a 5 de Dezembro em Alcântara, mostra uma diferença de concentrações baixa para o momento t_1 – entre 7,00E+04 NMP/100 mL à superfície e 1,10E+05 NMP/100 mL no fundo - que poderia ser gerada pelo erro associado ao método, contudo a replicação do teste confirma a existência de agregação de *E. coli* para aquele sedimento. A amostra do Parque das Nações apresenta diferenças nas concentrações de *E. coli* para as amostras das duas campanhas, sendo mais notória para a amostra de 27 de Abril (2,20E+02 NMP/100 mL à superfície e 9,20E+03 NMP/100 mL no fundo) Apesar das amostras terem sido mantidas a 4 °C, durante o período de sedimentação, verifica-se a ocorrência de crescimento bacteriano no decorrer do teste.

Os resultados observados no teste de agregação de *E. coli* ao sedimento são concordantes com as observações microscópicas dos sedimentos aquando da coloração com o corante Azul de Alcian – imagens B1, B2 e B3 da Figura 3.8, uma vez que a presença de EPS nos sedimentos confere propriedades adesivas. As amostras de Alcântara e do Parque das Nações, P3 e P4, onde praticamente todo o sedimento ficou corado correspondem às amostras onde o teste de agregação de *E. coli* confirmou a existência de agregação entre o sedimento e as bactérias e na amostra com menor fracção de sedimento corado, Algés (P2), mostrou-se não existir tendência para a agregação da *E. coli*.

3.2.4 Velocidades de queda

Para caracterizar os sedimentos em suspensão, para além das análises microscópica e granulométrica, foram também realizados três ensaios na coluna de sedimentação com as amostras provenientes dos pontos de amostragem Algés, Alcântara e Parque das Nações (pontos P2, P3 e P4, respectivamente). Através da determinação dos SST presentes nas sub-amostras resultantes do ensaio determinaram-se as velocidades de queda dos sedimentos amostrados (Tabela II.5, Tabela II.6 e Tabela II.7, em anexo). A Figura 3.10 apresenta os resultados da evolução da concentração média de SST ao longo dos três ensaios.

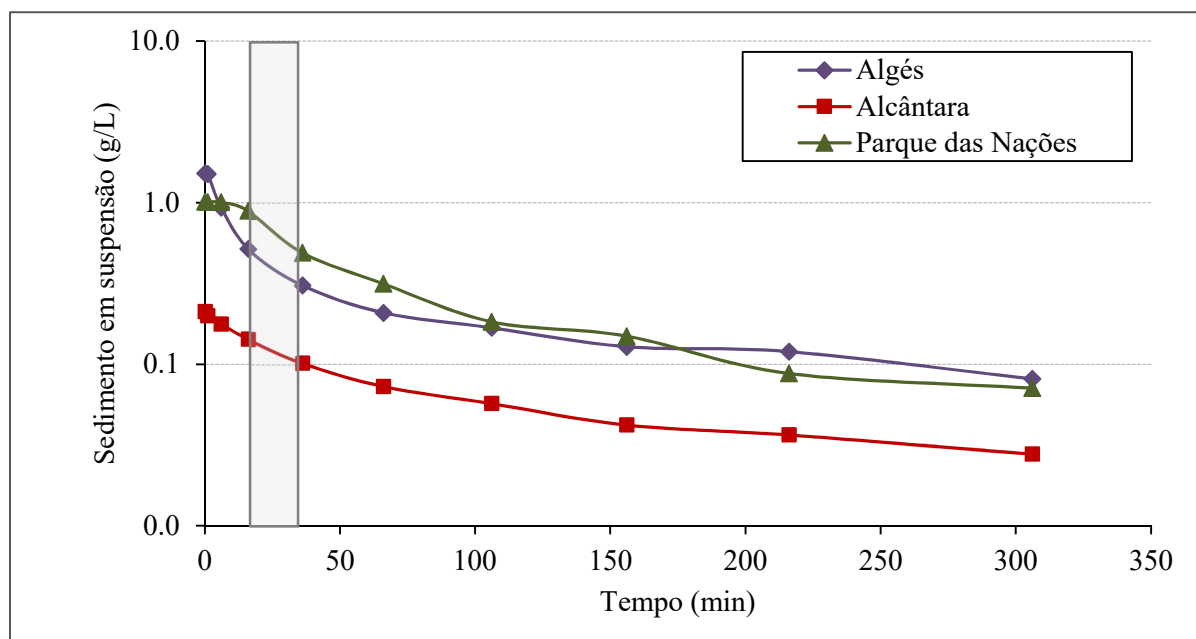


Figura 3.10 - Evolução da concentração média de sedimentos em suspensão no decorrer dos três ensaios.

A amostra de Alcântara continha uma concentração inicial de sedimentos em suspensão mais baixa (0,2g/L), comparativamente com as amostras do Parque das Nações (1g/L) e de Algés (1,5g/L). Para os primeiros 6 minutos dos ensaios não se observaram diferenças significativas na concentração de sedimento em suspensão para a amostra do Parque das Nações, o que poderá ser consequência de alguma turbulência residual proveniente da agitação para homogeneização realizada no começo do ensaio, contudo, para as amostras de Algés e Alcântara, no mesmo intervalo de tempo, ocorre uma redução de cerca de 40 % e 20 % do material em suspensão, respectivamente. Esta diferença poderá estar relacionada com a diferença de dimensões das partículas que constituem os sedimentos das várias amostras, nomeadamente as partículas de grandes dimensões presentes na amostra de Algés, como observado na análise microscópica (Figura 3.8), e a percentagem de sedimento com um diâmetro médio de 150 μm presente na amostra de Alcântara e detectada pela análise granulométrica (Figura 3.9). Para os três ensaios, observou-se que 2 horas após o começo do ensaio mais de 70% do sedimento já havia depositado e que ao fim de 5 horas (fim do ensaio) apenas permanecia em suspensão cerca de 10 % dos SST iniciais.

Para o ensaio com a amostra do Parque das Nações, no intervalo 16 min a 36 min, observa-se um aumento da velocidade de queda (Figura 3.10). Nos instantes anteriores a este intervalo a concentração de SST manteve-se pouco alterada face à concentração inicial. Este fenómeno poderá ser explicado pela formação de agregados fractais, que aumentam de dimensão à medida que as partículas vão descendo na coluna, pois quanto maior a dimensão fractal ou o tamanho do floco maior será a

velocidade de queda (Yang et al., 2016). Este fenómeno não se verificou no ensaio com a amostra de Algés, observando-se um decréscimo significativo dos SST logo nos primeiros instantes do ensaio. Isto sucede, possivelmente, devido às características deste sedimento não favorecerem a formação de agregados, tal como confirmado pelo teste de agregação de *E. coli* ao sedimento e pela coloração com Azul de Alcian, sendo deste modo o comportamento de sedimentação diferente para os sedimentos desta amostra. Por fim, no ensaio com a amostra de Alcântara, que apesar de ser um sedimento que apresentou formação de agregados na observação microscópica e que pela coloração com Azul de Alcian revelou ter alto teor em EPS, também não se observou o fenómeno de aumento de velocidade de queda. Neste caso, o facto de o ensaio ter sido realizado com uma concentração inicial de SST mais reduzida (0,2 g/L) provavelmente dificultou a detecção do fenómeno. Esta hipótese baseia-se nas observações de Ross e Mehta (1989) que sugeriram que ocorre sedimentação livre de sedimentos coesivos para concentrações baixas, menores que 0,4 g/L, pois as partículas não interagem umas com as outras e as forças resultam apenas da resistência do líquido e do peso aparente de cada sedimento.

Através do método utilizado para determinar o sedimento em suspensão nos 10 instantes de recolha de sub-amostras que ocorreram ao longo de cada ensaio (descrito na secção 2.3.4), estimaram-se as percentagens de matéria orgânica e inorgânica contidas nessas mesmas sub-amostras (SSTF e SSTV). Deste modo, procedeu-se ao cálculo da evolução da percentagem de matéria orgânica e inorgânica em suspensão ao longo dos ensaios (Figura II.2, Figura II.3 e Figura II.4, em anexo). Na Figura 3.11 são apresentados os resultados relativos às percentagens de SSTF e SSTV no início e no fim de cada um dos três ensaios realizados. Para os três pontos de amostragem observa-se que a proporção de matéria orgânica e inorgânica em suspensão não se mantém igual ao longo do ensaio. É visível uma diminuição da percentagem de matéria orgânica e um aumento proporcional da matéria inorgânica à medida que os ensaios decorrem. Esta diferença de velocidade de queda entre os dois tipos de matéria constituinte do sedimento é mais acentuada para o ensaio com amostra proveniente de Alcântara e menos evidente no ensaio com a amostra originária de Algés, amostras com maior e menor percentagem de SSTV, respectivamente. Os resultados sugerem que a matéria inorgânica tende a sedimentar mais depressa do que a matéria orgânica, indicando a influência da composição dos sedimentos nos processos de sedimentação.

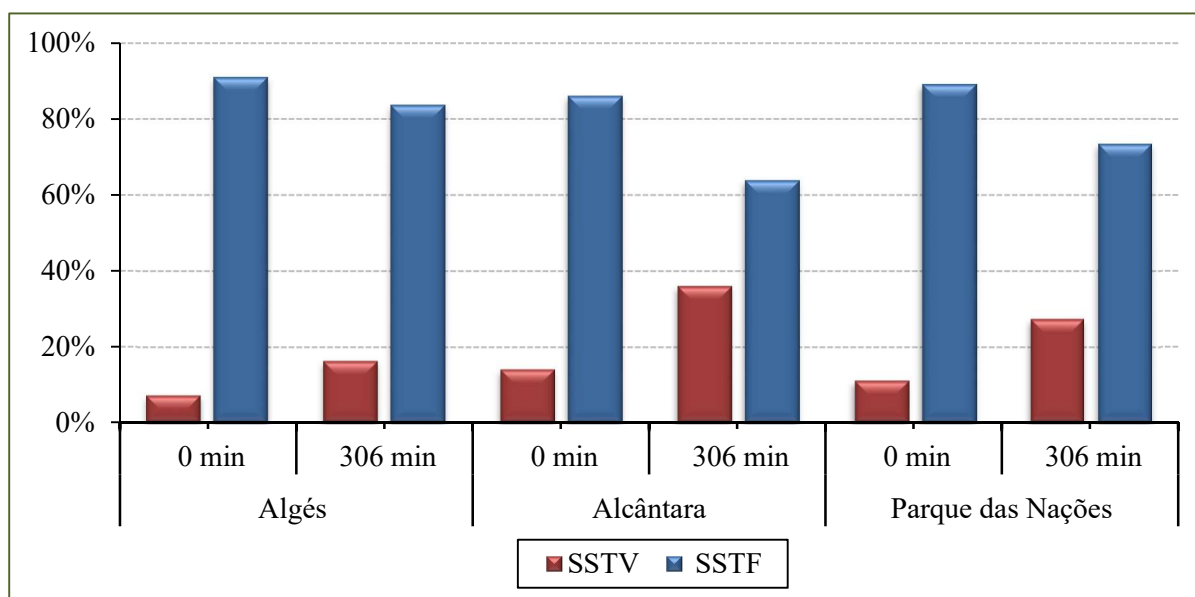


Figura 3.11 – Percentagem de SSTF e SSTV no início e no fim dos ensaios com amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações, P2, P3 e P4.

Foram também calculadas as velocidades de queda ao longo dos ensaios, com base na (Equação 2.6). Na Figura 3.12 são apresentadas as velocidades de queda obtidas nos três ensaios, para cada intervalo de tempo em função da concentração do sedimento em suspensão. Não foram considerados os primeiros 6 minutos, exclusive, do ensaio visto que poderá permanecer alguma turbulência decorrente da rotação da coluna para homogeneização da amostra no início do ensaio e para o ensaio do Parque das Nações não se considerou os primeiros 16 minutos devido à variação da velocidade descrita a cima. Os valores máximos de velocidade de queda foram atingidos no intervalo 6 a 16 minutos para os ensaios com as amostras da Algés, e de Alcântara, e no intervalo 16 a 36 para o ensaio com a amostra do Parque das Nações.

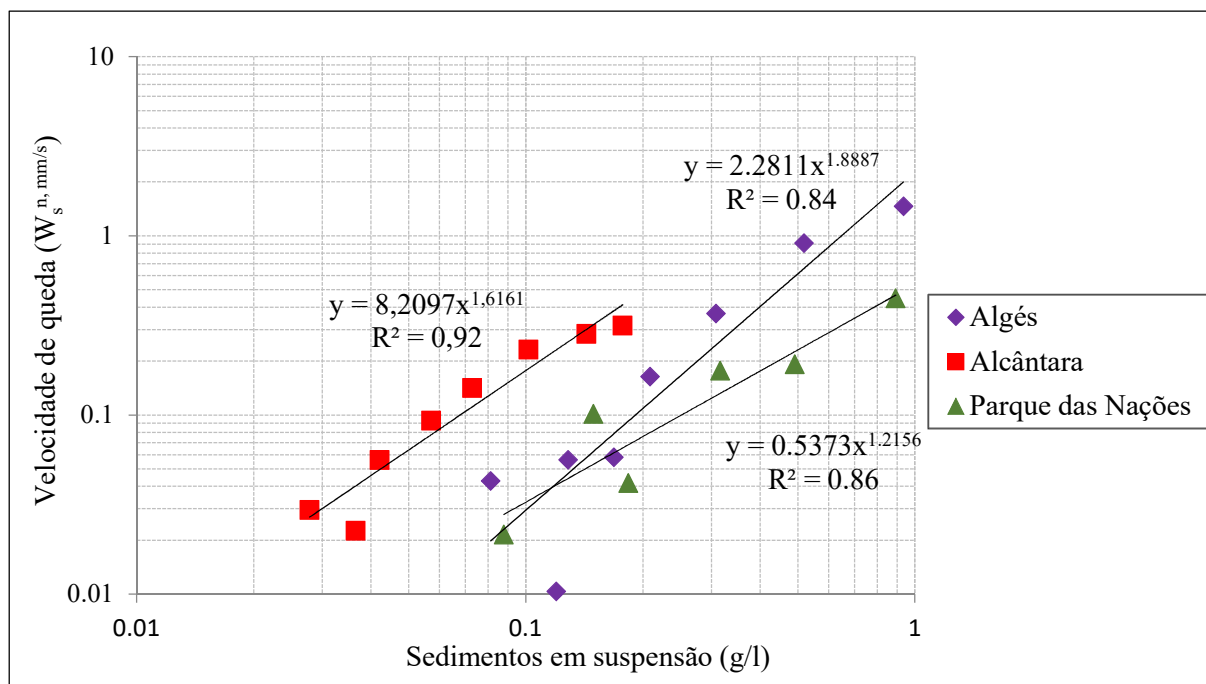


Figura 3.12 – Velocidade de queda dos sedimentos em função da concentração. Resultados dos ensaios com amostras de Algés, Alcântara e Parque das Nações.

Ao se comparar os resultados obtidos nos três ensaios realizados observa-se que o sedimento da amostra de Algés atinge uma velocidade de queda mais rápida quando comparado como o dos outros dois pontos amostrados. A baixa concentração de SST no início do ensaio com a amostra proveniente de Alcântara dificultou a comparação com os outros dois ensaios e limitou as conclusões tiradas relativamente a este tipo de sedimento. Note-se ainda que nos primeiros minutos deste ensaio, com a amostra de Alcântara, observou-se a formação de uma camada de espuma na superfície da amostra de água após a homogeneização, de onde se originaram agregados visíveis a olho nu que sedimentaram rapidamente.

A velocidade de queda mediana (velocidade correspondente à deposição de 50 % da massa da matéria em suspensão) foi de 1,2 mm/s para Algés, 0,24 mm/s para Alcântara e de 0,45 mm/s para o Parque das Nações.

4. Discussão

No presente trabalho pretendeu-se compreender melhor a influência dos sedimentos em suspensão no transporte de *E. coli* em sistemas estuarinos. Em particular, pretendeu-se avaliar a influência dos sedimentos em suspensão na intensidade e penetração da radiação solar, perceber a capacidade dos sedimentos em suspensão para adsorver e transportar células de *E. coli*, estudar as principais características dos sedimentos em suspensão em diferentes zonas do estuário e obter bases para melhorar a descrição da evolução de plumas de contaminação fecal. Discutem-se de seguida os resultados obtidos face aos objectivos do estudo.

4.1 Caracterização físico-química e microbiológica

Os resultados obtidos no âmbito da caracterização físico-química e microbiológica da água forneceram uma fonte complementar à análise dos dados históricos existentes. De um modo geral, os resultados mostraram concentrações mais elevadas de *E. coli* durante a baixa-mar face às concentrações de preia-mar, o que indica uma maior concentração das plumas de *E. coli* devido ao menor volume de água no estuário bem como a ocorrência de transporte de montante para jusante destas plumas, pondo em evidência a importância da maré nesta dinâmica.

As concentrações de *E. coli* observadas, nomeadamente em Alcântara (7,80E+01 a 3,50E+04 NMP/100ml), são da mesma ordem de grandeza ou inferiores às observadas em amostragens anteriores neste local (1,10E+01 a 2,40E+06 NMP/100ml; observações realizadas entre 2011 e 2014 de acordo com David et al., 2015; dados não publicados). Também as concentrações de SST observadas em Alcântara no âmbito da amostragem deste estudo (0,0218 a 0,0372 g/L) encontram-se dentro do intervalo de observações anteriores no local (0,008 a 0,219 g/L; observações realizadas entre 2011 e 2014 de acordo com David et al., 2015; dados não publicados). Importa, no entanto, notar que a amostragem realizada por David et al. (2015) teve uma maior abrangência temporal e incluiu, em particular, períodos de precipitação elevada com caudais efluentes significativos e com maiores concentrações de *E. coli* e SST. A ETAR de Alcântara é a descarga urbana no estuário mais importante, possuindo capacidade para um caudal de ponta de 3,3 m³/s em tempo seco e de 6,6 m³/s em tempo de chuva e descarregando em tempo de chuva o efluente unitário gerado na maior bacia gravítica da cidade (Rodrigues et al., 2016).

As concentrações de *E. coli* observadas foram mais elevadas em Algés, podendo estar simultaneamente relacionadas com a baixa profundidade do local, que corresponde assim a um menor volume de água para diluição, e a sua proximidade da margem, onde existe uma reduzida renovação da água. Outro factor que possivelmente teve influência neste resultado foi a ocorrência de pequenas descargas observadas no local no momento da amostragem. Dado que a presente amostragem foi realizada a partir da margem, este é também um aspecto relevante na análise dos resultados, pois as plumas de descargas de efluentes urbanos no estuário do Tejo tendem a ficar adjacentes à margem (Costa et al., 2012) e ter uma influência significativa a nível local (Rodrigues et al., 2016).

Importa ainda salientar que a amostragem realizada, embora cumpra os objectivos a que se propõe no âmbito do presente trabalho, apresenta limitações significativas para uma caracterização detalhada às várias escalas espaciais e temporais da qualidade microbiológica da água no estuário do Tejo. A

implementação de um plano de monitorização detalhado, com uma maior abrangência espacial e temporal no local estudo, permitiria mitigar estas limitações, bem como forneceria uma caracterização mais abrangente e contextualizada do local.

A análise exploratória de relações entre parâmetros físico-químicos e microbiológicos realizada sugere algumas correlações entre *E. coli* e SST, nomeadamente para concentrações mais elevadas de SST. Foram também observadas correlações entre SST e a turvação. Este tipo de análise tem sido realizado por outros autores visando uma estimativa mais expedita e atempada de indicadores da qualidade microbiológica (e.g. Christensen et al., 2001, 2002; David e Haggard, 2011), dado que a necessidade de recolha de amostras de água e a sua análise em laboratório, mesmo utilizando métodos mais expeditos (Lebaron et al., 2005), constitui uma limitação quando se pretende obter informação atempadamente, nomeadamente durante eventos de contaminação fecal. Por exemplo, Christensen et al. (2001) estabeleceu um modelo de regressão que permite estimar a concentração de coliformes fecais com base em medições contínuas de turvação no Little Arkansas River. Face ao número pouco elevado de amostras do presente estudo não é possível estabelecer um modelo de regressão semelhante. No entanto, os resultados preliminares obtidos devem ser explorados futuramente através da realização de amostragens mais detalhadas.

4.2 Influência dos sedimentos em suspensão na penetração da radiação solar

Existem diversos factores ambientais que afectam a sobrevivência de bactérias no meio aquático e a radiação solar é comumente destacada como sendo o principal. Em particular, estudos mostram que a radiação UV-B é a gama com maior impacto nas taxas de decaimento de *E. coli* (Maraccini et al., 2016, 2016a). Contudo, este efeito bactericida da radiação solar pode ser atenuado, por exemplo pela existência de partículas em suspensão na coluna de água. Deste modo, foi realizada uma análise da penetração da radiação UV-B, para os comprimentos de onda de 280 nm, 300 nm e 320 nm, em diferentes amostras de água relacionando com o conteúdo destas em SST. Para estas amostras, que foram recolhidas em Algés, Alcântara e no Parque das Nações, foi também efectuada uma caracterização dos sedimentos nelas contidos.

Para as radiações de 280 nm, 300 nm e 320 nm, os resultados obtidos sugerem que 90 % da radiação se extingue à profundidade de 0,3 m, 0,35 m e 0,7 m, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os resultados de estudos anteriores realizados em zonas estuarinas (Tedetti e Sempéré, 2006). Esta atenuação da radiação UV-B sugere que o efeito bactericida da radiação solar apenas apresenta especial relevância até cerca de 1 m de profundidade, sendo deste modo praticamente indetectável em casos de sistemas aquáticos com grandes profundidades. No caso particular do estuário do Tejo, área de estudo considerada, as profundidades variam entre poucos metros e cerca de 50 m nas zonas mais profundas, deste modo é expectável que o efeito bactericida da radiação solar tenha significado nas zonas menos profundas e à superfície e não seja um factor preponderante na sobrevivência de *E. coli* presente nas zonas mais profundas do estuário.

Os resultados mostram também que a radiação de 320 nm tem um comportamento muito diferente comparativamente com as outras duas radiações analisadas e que nas mesmas condições atinge profundidades mais elevadas. Estudos mostram que a radiação UV-A penetra até maiores profundidades do que a radiação UV-B (Conde et al, 2000; Tedetti e Sempéré, 2006), o que poderá estar associado a esta diferença observada, uma vez que a radiação de 320 nm se encontra no limite entre a radiação UV-B e UV-A.

Para as radiações de 280 nm e 300 nm parece existir relação directa entre a atenuação de radiação e a concentração de SST, tal como já havia sido demonstrado em outros estudos (Conde et al, 2000). Esta relação não se verifica no caso da radiação de 320 nm. Destaca-se ainda que os valores de K_d máximos observados para as radiações de 280 nm, 300 nm e 320 nm foram de 0,0042 m⁻¹, 0,00387 m⁻¹ e 0,00123 m⁻¹, correspondendo às profundidades de extinção de 90 % da radiação de 0,055 m, 0,06 m e 0,19 m, respectivamente.

A atenuação da radiação UV-B na coluna de água depende também de matéria orgânica natural dissolvida em particular de substâncias húmicas que absorvem radiação nesta gama de comprimentos de onda (Scully e Lean, 1994; Conde et al., 2000). A variação do K_d obtido para os diferentes pontos de amostragem poderá assim estar também associada a diferenças na concentração e o tipo de matéria orgânica nas águas analisadas. Essa avaliação não foi feita nesta tese por estar fora do seu âmbito.

4.3 Influência dos sedimentos em suspensão para adsorver e transportar células de *E. coli*.

Além das substâncias húmicas, as águas superficiais contêm EPS (substâncias poliméricas extracelulares) com propriedades químicas específicas que lhes permite interagir, via colisão, com outras substâncias dissolvidas ou partículas em suspensão (incluindo microrganismos), resultando na formação de flocos. Estes flocos com dimensões típicas de 10-500 µm têm tendência a agregarem-se formando estruturas complexas e fractais (Tan et al, 2012). Assim o processo de floculação resultante da colisão do material inorgânico particulado com as moléculas de EPS dissolvidas poderá influenciar a dinâmica dos sedimentos, por alterarem a sua dimensão e estrutura e consequentemente a velocidade de sedimentação.

A observação microscópica dos sedimentos revelou um comportamento de agregação para as amostras provenientes de Alcântara e do Parque das Nações, o que não sucedeu com a amostra colhida em Algés em que não foram observados flocos. Observou-se também a existência de um alto teor em EPS e de resultados positivos para o teste de agregação de *E. coli* aos sedimentos nas amostras de Alcântara e do Parque das Nações. Deste modo, os resultados apontam para uma relação entre o comportamento de agregação e a presença de EPS como constituinte dos sedimentos. Conclui-se também que as diferentes características dos sedimentos, podem influenciar a sua capacidade para adsorver bactérias.

Foi realizada uma análise de ferro aos sedimentos com o intuito de perceber se existe relação entre a presença de ferro e a propensão para agregação, visto que como mencionado por van Leussen (1999) a existência de um revestimento metálico nos sedimentos favorece a floculação, ou seja, a agregação das partículas em estruturas fractais de maiores dimensões. No caso dos sedimentos analisados os resultados parecem indicar que a presença de ferro não é um factor determinante para a agregação das bactérias ao sedimento.

Por fim foi ainda realizada uma análise da velocidade de queda dos sedimentos. A velocidade de queda dos sedimentos coesivos é influenciada por vários factores, nomeadamente (Cuthbertson et al., 2008): as propriedades das partículas (i.e., dimensão, densidade, forma, estrutura), a concentração das partículas em suspensão, os níveis de turbulência do escoamento e as propriedades do fluido (i.e., viscosidade e salinidade). Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a influência de alguns destes factores.

De um modo geral, observam-se comportamentos distintos no que se refere à velocidade de queda dos sedimentos da amostra de Algés, comparativamente com os sedimentos das amostras de Alcântara e do Parque das Nações. Na amostra recolhida em Algés observou-se uma velocidade de sedimentação inicial mais elevada, sendo a velocidade de queda mediana de 1,2 mm/s (variação entre 0,04 – 1,45 mm/s), e um comportamento uniforme da velocidade de queda ao longo da coluna de sedimentação. No que se refere às amostras de Alcântara e do Parque das Nações, observaram-se maiores variações da velocidade de queda ao longo da coluna de sedimentação e velocidades de queda medianas mais baixas, de 0,24 mm/s (variação entre 0,03 – 0,31 mm/s) e 0,45 mm/s (variação entre 0,02 – 0,45 mm/s), respectivamente.

As diferenças observadas poderão ser explicadas em parte pelas diferenças na estrutura e granulometria dos sedimentos em suspensão nos locais amostrados.

Para o ensaio com a amostra do Parque das Nações, após uma diminuição reduzida da concentração de SST nos instantes iniciais do ensaio, verificou-se um aumento acentuado da velocidade de queda no intervalo 16 - 36 min. Este fenómeno poderá ser explicado pela formação de agregados fractais, que aumentam de dimensão à medida que as partículas vão descendo na coluna, sugerindo assim a existência de floculação para os sedimentos do Parque das Nações. O sedimento proveniente de Alcântara, apesar de apresentar propensão para agregar, a baixa concentração inicial de SST deve, muito provavelmente, ter obstado a ocorrência de floculação durante o ensaio. Para o ensaio com a amostra de Algés observou-se um comportamento de sedimentação mais uniforme resultantes das diferentes características deste sedimento, em particular, ser constituído por partículas de grandes dimensões, com maior teor de matéria inorgânica e a presença de EPS ser reduzida.

Foi também feita uma análise da evolução da percentagem de matéria orgânica e inorgânica em suspensão na coluna de sedimentação no decorrer de cada ensaio e os resultados obtidos sugerem que a matéria inorgânica tende a sedimentar mais depressa do que a matéria orgânica, indicando a influência da composição e, conseqüentemente, da estrutura (e.g., porosidade) e densidade dos sedimentos nos processos de sedimentação.

Comparativamente com os valores de velocidade de queda obtidos noutros estudos em estuários portugueses os valores obtidos no presente estudo são da mesma ordem de grandeza. Em particular, no estuário do Tejo, Portela et al. (2013) estimou velocidades de queda de aproximadamente 0,01 - 1 mm/s e de velocidade de queda mediana entre 0,02 - 0,7 mm/s para salinidades variáveis entre 0 e 30, utilizando sedimentos recolhidos na zona do Parque das Nações com diâmetros D_{10} , D_{50} e D_{90} de 2 μm , 9 μm e 37 μm , respectivamente. Na Ria de Aveiro, Ribeiro (2014) obteve valores de velocidade de queda de 0,04 – 1,61 mm/s e de velocidade de queda mediana entre 0,42 - 0,83 mm/s para amostras com diâmetros D_{10} , D_{50} e D_{90} de aproximadamente 5, 25 e 100 μm .

Comummente a velocidade de queda de sedimentos coesivos em ambientes estuarinos é representada em função da concentração dos sedimentos em suspensão no local. Algumas das formulações propostas consideram os processos de floculação (e.g., Winterwerp, 2002) ou a influência de factores que influenciam a floculação (Einstein and Krone, 1962), assim como a existência de misturas de sedimentos coesivos e não coesivos (Cuthbertson et al., 2008). Seguindo a abordagem de Portela et al. (2013) no presente estudo relacionou-se também a velocidade de queda com a concentração de SST. A estimativa das velocidades de queda para as concentrações médias de SST observadas em Alcântara no decurso do presente estudo (aproximadamente 0.030 g/L) com a aproximação obtida é de 0,03 mm/s. Comparando com a estimativa de 0,001 mm/s com base em Portela et al. (2013) e de 0,04 mm/s com base em Ribeiro (2014), ambos para uma salinidade de 30. Note-se que para a amostra

do Parque das Nações, o coeficiente de determinação obtido foi relativamente baixo, o que poderá estar associado ao comportamento diferente observado neste ensaio (conforme referido anteriormente) e sugerir que a representação da velocidade de queda em função da concentração de SST para estes sedimentos poderá não ser a abordagem mais adequada.

4.4 Previsão da qualidade microbiológica da água

Os resultados obtidos no presente estudo poderão ser utilizados para melhorar o desenvolvimento de sistemas de previsão da qualidade da água. Os sistemas de previsão permitem a antecipação de situações de contaminação a escalas temporais curtas, contribuindo para a adoção atempada de medidas de prevenção e a minimização de impactes negativos (Rodrigues et al., 2016). A utilização destes sistemas como suporte à gestão da qualidade microbiológica da água é recente (e.g. Thoe et al., 2012; Rodrigues et al., 2013; Bedri et al., 2014; Oliveira et al., 2014) e apresenta ainda inúmeros desafios. Entre eles, encontram-se os desafios ao nível da precisão dos modelos numéricos, nomeadamente através da melhoria da representação dos processos de transporte e mortalidade de FIB.

Os modelos numéricos de qualidade da água apresentam diferentes níveis de complexidade na representação dos processos físicos, químicos e biológicos. Tipicamente, estes modelos representam o decaimento das bactérias entéricas através de constantes (e.g. Kashefipour et al., 2002), embora existam algumas formulações específicas dependentes de parâmetros ambientais (e.g. Rodrigues et al., 2011, Servais et al., 2007). Menos comum é a inclusão de processos relacionados com os sedimentos em suspensão (e.g., Steets and Holden, 2003; Brauwere et al., 2014).

Os resultados obtidos, em particular, poderão contribuir para melhorar a representação dos processos de decaimento de FIB nos modelos implementados no estuário do Tejo (e.g. Rodrigues et al., 2013; David et al., 2015). Nomeadamente, estes resultados sugerem a existência de agregação de bactérias entéricas aos sedimentos em suspensão, caracterizada por uma variabilidade espacial associada às características dos sedimentos em suspensão, pelo que importa considerar os processos de agregação aos sedimentos na simulação do transporte de FIB. Verifica-se também uma diminuição do efeito da radiação solar com concentrações mais elevadas de SST e que a extinção de 90 % da radiação UV-B ocorre até cerca de 1 m profundidade, pelo que este efeito deverá ser pouco significativo para o decaimento das bactérias entéricas nas zonas mais profundas do estuário, devendo as formulações de decaimento a implementar ter em consideração esta dinâmica. Os resultados sugerem ainda variações das velocidades de queda ao longo do estuário, que em alguns locais, em função das características dos sedimentos em suspensão, poderão estar dependentes de processos de floculação. A consideração da influência deste efeito na simulação da velocidade de queda poderá, assim, ser relevante.

5. Considerações finais

A contaminação microbiológica de sistemas aquáticos e, em particular, de sistemas estuarinos pode levar a consideráveis impactos negativos, tratando-se assim de uma forte ameaça à qualidade das suas águas e ao equilíbrio entre todos os organismos que o constituem e do qual dependem. Melhorar a compreensão dos processos que afectam a sobrevivência de bactérias entéricas é, assim, fundamental para apoiar a gestão da qualidade da água em sistemas estuarinos. Em particular, uma melhor compreensão destes processos poderá apoiar a implementação de planos de monitorização mais eficazes e de sistemas de previsão que permitam perceber o comportamento das FIB e antecipar eventos de contaminação.

A sobrevivência das bactérias entéricas em meio aquático depende de vários factores abióticos e bióticos. Embora a radiação solar seja comumente considerada o principal factor que afecta o decaimento das bactérias entéricas em sistemas aquáticos, a sua importância pode ser sobrevalorizada se a dinâmica do sistema e outros mecanismos relevantes não forem considerados. Os sedimentos em suspensão, em particular, podem afectar os processos de decaimento e de transporte dos microrganismos, por exemplo, ao influenciarem a penetração da radiação UV na coluna de água, ao adsorverem as bactérias e em seguida sedimentarem (Jeng et al., 2005) ou pela sua ressuspensão na coluna de água (Anderson et al., 2005).

Este estudo abordou a influência da sedimentação de sedimentos em suspensão na dinâmica da contaminação fecal no estuário do Tejo. Em particular, pretendeu-se melhorar a compreensão da influência dos sedimentos em suspensão no transporte de *E. coli* e avaliar a importância deste processo na sua distribuição espacial e temporal, nomeadamente ao nível da capacidade dos sedimentos para adsorver e transportar células de *E. coli* e da influência dos sedimentos na intensidade e penetração da radiação solar.

No estuário do Tejo observaram-se concentrações mais elevadas de *E. coli* durante a baixa-mar face às concentrações de preia-mar, pondo em evidência a importância da maré na dinâmica do transporte de plumas de *E. coli* no estuário, assim como concentrações mais elevadas junto ao fundo. Salientam-se também as correlações encontradas entre a concentração de *E. coli* e a concentração de SST, que sugere uma tendência para o aumento de *E. coli* com o aumento de SST, e entre a concentração de SST e a turvação na análise exploratória realizada. Estes resultados devem ser explorados em estudos de investigação futura através da realização de amostragens mais detalhadas. No que se refere à penetração da radiação UV na coluna de água do estuário do Tejo, os resultados obtidos sugerem que a extinção da radiação UV-B ocorre até cerca de 1 m de profundidade e demonstram a influência dos sedimentos em suspensão na atenuação da penetração da radiação solar. Nas zonas mais profundas do estuário a radiação solar não deverá ser, assim, um factor predominante para o decaimento de *E. coli*.

Os resultados obtidos sugerem a existência de agregação das bactérias aos sedimentos em suspensão na coluna de água, embora com uma variabilidade espacial associada ao tipo e estrutura do sedimento. Nas amostras em que se observou a agregação de *E. coli* aos sedimentos em suspensão (Alcântara e Parque das Nações), verificou-se a tendência para formação de flocos e a existência de um alto teor em EPS, sugerindo uma relação entre o comportamento de agregação e a presença de EPS como constituinte dos sedimentos. No que se refere à presença de ferro, no caso dos sedimentos

analisados os resultados parecem indicar que este não é um factor determinante para a agregação das bactérias ao sedimento.

As diferenças observadas na estrutura e granulometria dos sedimentos em suspensão nos locais amostrados influenciaram também os comportamentos observados no que se refere às velocidades de queda, sugerindo variações das velocidades de queda ao longo do estuário e a influência de processos de floculação em algumas amostras. Em Algés ($D_{50} = 19 \mu\text{m}$, sem formação de flocos) a velocidade de queda mediana foi 1,2 mm/s (variação entre 0,04 – 1,45 mm/s), tendo-se observado um comportamento uniforme da velocidade de queda ao longo da coluna de sedimentação. Nas amostras de Alcântara ($D_{50} = 23 \mu\text{m}$) e do Parque das Nações ($D_{50} = 12 \mu\text{m}$) observaram-se velocidades de queda medianas mais baixas, de 0,24 mm/s (variação entre 0,03 – 0,31 mm/s) e 0,45 mm/s (variação entre 0,02 – 0,45 mm/s), respectivamente, bem como maiores variações da velocidade de queda ao longo da coluna de sedimentação, para o ensaio com a amostra do Parque das Nações.

Como trabalho futuro seria útil a realização deste tipo de estudos com maior abrangência no que se refere ao número de amostras e locais de colheita, de modo a complementar, aprofundar e validar os resultados obtidos. Duma caraterização mais extensiva e representativa de parâmetros ambientais da água do estuário, da composição e estrutura, bem como da relação entre estes parâmetros e a dinâmica da sedimentação, agregação e transporte de células bacterianas poderão resultar dados e conhecimentos úteis para descrever e prever a dinâmica das plumas de contaminação fecal em estuários.

6. Referências

APA – www.apambiente.pt [acedido a: 4/08/2017]

APA – Agência Portuguesa do Ambiente, 2012. Plano de Gestão da Região Hidrográfica do Tejo, Relatório Técnico – Síntese. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território.

APA – Agência Portuguesa do Ambiente, 2016. Plano de Gestão de Região Hidrográfica, Região Hidrográfica do Tejo e Ribeiras do Oeste (RH5). Parte 2 – Caracterização e Diagnóstico.

APA, 2016a – Fichas de caracterização ecológica e de gestão dos valores naturais do Plano Setorial da Rede Natura 2000. Sítio Estuário do Tejo.

APA, 2016b - Fichas de caracterização ecológica e de gestão dos valores naturais do Plano Setorial da Rede Natura 2000. ZPE Estuário do Tejo.

Barbier, E.B., Hacker, S.D., Kennedy, C., Koch, E.W., Stier, A.C., Silliman, B.R., 2011. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 81(2), 169-193.

Becker, M.S., Pollard, W.H., 2016. Sixty-year legacy of human impacts on a high Arctic ecosystem *Journal of Applied Ecology*, 53, 876–884.

Bedri, Z., Corkery, A., O'Sullivan, J.J., Alvarez, M.X., Erichsen, A.C., Deering, L.A., Demeter, K., O'Hare, G.M.P., Meijer, W.G., Masterson, B. (2014). An integrated catchment-coastal modelling system for real-time water quality forecasts. *Environmental Modelling & Software*, 61, 458–476.

Belkin, S., Colwell, R.R, 2005. *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. New York Springer, pp 464.

Bernardino, A.F., Netto, S.A., Pagliosa, P.R., Barros, F., Christofoletti, R.A., Filho, J.S.R., Colling, A. and Lana, P.C., 2015. Predicting ecological changes on benthic estuarine assemblages through decadal climate Trends along Brazilian Marine Ecoregions. *Estuarine Coastal And Shelf Science*, 166, 74-82.

Berney, M., Weilenmann, H.-U., Simonetti, A., Egli, T., 2006. Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhimurium* and *Vibrio cholera*. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 828–836.

Boivina, N.L., Zederc, M.A., Fuller, D.Q., Crowtherf, A., Larsong, G., Erlandsonh, J.M., Denhami, T., Petraglia, M.D., 2016. Ecological consequences of human niche construction: Examining long-term anthropogenic shaping of global species distributions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (23), 6388–6396.

Brauwere, A., Gourgue, O. Brye B., Servais, P. Ouattara, N.F., Deleersnijder, E., 2014. Integrated modelling of faecal contamination in a densely populated river–sea continuum (Scheldt River and Estuary). *Science of the Total Environment*, 468–469, 31-45.

Brito, F., 2008. Coluna de Sedimentação, Manual de Utilização. Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Departamento de Hidráulica e Ambiente, Núcleo de Estuários e Zonas Costeiras.

Cabral, H.M.R.N, 1998. Utilização do estuário do tejo como área de viveiro pelos linguados, solea solea (L., 1758) e solea senegalensis kaup, 1858, e robalo, dicentrarchus labrax (L., 1758). Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.

Cabral, J., 2010. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. International Journal of Environmental Research and Public Health, 7, 3657-3703.

Castanheiro, J.M., 1986. Distribution, transport and sedimentation of suspended matter in the Tejo Estuary. In Estuarine processes: an application to the Tagus Estuary. Secretaria de Estado do Ambiente e Recursos Naturais, Lisboa, 75-90.

Chandran, A., Hatha A.A.M., 2005. Relative survival of Escherichia coli and Salmonella typhimurium in a tropical estuary. Water Research, 39 (7), 1397–1403.

Christensen V.G., Rasmussen P.P., Ziegler A.C. (2002). Real-time water quality monitoring and regression analysis to estimate nutrient and bacteria concentrations in Kansas streams. Water Science and Technology, 45 (9), 205–211.

Christensen V.G., Rasmussen P.P., Ziegler A.C., Xiaodong J. (2001). Continuous monitoring and regression analysis to estimate bacteria loads. Proceedings of TMDL Science Issues Conference (St. Louis, Missouri: Water Environment Federation), 405-411.

Clesceri, L., Greenberg, A., Eaton, A., (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed., American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), USA.

CML – Câmara Municipal de Lisboa, 2014. Principais descargas de águas residuais urbanas no estuário do Tejo. Caracterização físico-química e radiológica 2003 – 2013. Fevereiro 2014. Câmara Municipal de Lisboa, Direção Municipal de Ambiente Urbano Departamento de Ambiente e Espaço Público, Divisão do Ambiente.

Conde, D., Aubriot, L., Sommaruga, R., 2000. Changes in UV penetration associated with marine intrusions and freshwater discharge in a shallow coastal lagoon of the Southern Atlantic Ocean. Marine Ecology Progress Series, 207, 19-31.

Cuthbertson, A., Dong, P., King, S., 2008. Hindered settling velocity of cohesive/non-cohesive sediment mixtures. Coastal Engineering, 5 (12), 1197-1208.

David, L.M., Rodrigues, M., Fortunato, A.B., Oliveira, A., Mota, T., Costa, J., Rogeiro, J., Jesus, G., Gomes, J.L., Menaia, J., David, C., Póvoa, P., Frazão, A., Matos, R., 2015. Demonstration system for early warning of faecal contamination in recreational waters in Lisbon. Climate Change, Water Supply and Sanitation: Risk Assessment, Management, Mitigation and Reduction, IWA Publishing, Hulsmann A. et al. (eds), Chapter 1- Demonstrations , subchapter 1.4, 10 pages, ISBN13: 9781780404998, eISBN: 9781780405001 David M.M., Haggard B.E. (2011). Development of regression-based models to predict fecal bacteria numbers at select sites within the Illinois River Watershed, Arkansas and Oklahoma, USA. Water, Air & Soil Pollution, 215, 525–547.

Einstein, H.A., Krone, R.B., 1962. Experiments to determine modes of cohesive sediment transport in salt water. *Journal of Geophysical Research*, 67.

Ellis, E.C., 2011. Anthropogenic transformation of the terrestrial biosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 369, 1010–1035.

Fortunato, A.B, Baptista, A.M, Luetlich, Jr.R.A., 1997. A three-dimensional model of tidal currents in the mouth of the Tagus Estuary. *Continental Shelf Research* 17 (14), 1689-1714.

Fortunato, A.B, Oliveira, A., Baptista, A.M., 1999. On the effect of tidal flats on the hydrodynamics of the Tagus estuary. *Oceanologica Acta*, 22 (1), 31-44.

Franz, G., Pinto, L., Ascione, I., Mateus, M., Fernandes, R., Leitão, P., Neves, R., 2014. Modelling of cohesive sediment dynamics in tidal estuarine systems: Case study of Tagus estuary, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 151, 34-44.

Freire, P.M.S, 1999. Evolução morfo-sedimentar de margens estuarinas (estuário do Tejo, Portugal). Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.

Freire, P., 2003. Análise granulométrica por difracção laser de sedimentos silto-argilosos, Procedimento de ensaio. Relatório 239/2003-NEC. Lisboa.

Freire, P., Taborda, R., Andrade, C., 2006. Caracterização Das Praias Estuarinas Do Tejo. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos, 1-12.

Guerreiro, M., Fortunato, A.B., Freire P., Rilo, A., Taborda, R., Freitas, M.C., Andrade, C., Silva, T., Rodrigues, M., Bertin, X., Azevedo, A., 2015. Evolution of the hydrodynamics of the Tagus estuary (Portugal) in the 21st century. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, 15 (1), 65-80.

Gutiérrez-Cacciabue, D., Cid, A.G., Rajal, V.B., 2016. How long can culturable bacteria and total DNA persist in environmental waters? The role of sunlight and solid particles. *Science of the Total Environment*, 539, 494–502.

Huovinen, P.S., Penttilä, H., Soimasuo, M.R., 2003. Spectral attenuation of solar ultraviolet radiation in humic lakes in Central Finland. *Chemosphere*, 51, 205–214.

ICNF - www.icnf.pt [acedido a: 15/06/2017]

INE – www.censos.ine.pt [acedido a: 13/06/2017]

Ismail, N.S., Tommerdahl, J.P., Boehm, A.B., Luthy, R.G., 2016. *Escherichia coli* Reduction by Bivalves in an Impaired River Impacted by Agricultural Land Use. *Environmental Science and Technology*. 50, 11025–11033.

Jarvis, B., Wilrich, C., Wilrich, P.-T., 2010. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1660 – 1667.

Jeng, H.A.C, Engle, A.J., Baker, R.M., Bradford, H.B., 2005. Impact of urban stormwater runoff on estuarine environmental quality. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 63 (4), 513-526.

Jiang, Z., Liu, J., Chen, J., Chen, Q., Yan, X., Xuan, J., Zeng, J., 2014. Responses of summer phytoplankton community to drastic environmental changes in the Changjiang (Yangtze River) estuary during the past 50 years. *Water Research*, 54, 1-11.

Jozić, S., Morović, M., Šolić, M., Krstulović, N., Ordulj, M., 2014. Effect of solar radiation, temperature and salinity on the survival of two different strains of *Escherichia coli*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23 (8), 1852 – 1859.

Kashefipour, S.M, Lin, B., Harris, E. Falconer, R.A., 2002. Hydro environmental modelling for bathing water compliance of an estuarine basin. *Water Research* 36, 1854–1868.

Kinnaman, A.R., Surbeck, C.Q., Usner, D.C., 2012. Coliform Bacteria: The Effect of Sediments on Decay Rates and on Required Detention Times in Stormwater BMPs. *Scientific Research*, 3, 787-797.

Lebaron P., Henry A., Lepeuple A.-S., Pena G., Servais P. (2005). An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing waters. *Marine Pollution Bulletin*, 50 (6), 652–659.

Maraccini, P.A., Mattioli, M.C.M., Sassoubre, L.M., Cao, Y., Griffith, G.F., Ervin, J.S., Van De Werfhorst, L.C., Boehm, A.B., 2016. Solar Inactivation of Enterococci and *Escherichia coli* in Natural Waters: Effects of Water Absorbance and Depth. *Environmental Science and Technology* 50, 5068–5076.

Maraccini, P.A., Wenk, J., Boehm, A.B., 2016a. Exogenous indirect photoinactivation of bacterial pathogens and indicators in water with natural and synthetic photosensitizers in simulated sunlight with reduced UVB. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 587—597.

McLusky, D.S., Elliott, M., 2004. *The Estuarine Ecosystem ecology, threats and management*. Thrid Edition. New York. Oxford, pp 224.

Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *ECOSYSTEMS AND HUMAN WELL-BEING: WETLANDS AND WATER Synthesis*. World Resources Institute, Washington, DC.

Mika, K.B., Imamura, G., Chang, C., Conway, V., Fernandez, G., Griffith, J.F., Kampalath, R.A., Lee, C.M., Lin, C.-C., Moreno, R., Thompson, S., Whitman, R.L., Jay, J.A., 2009. Pilot- and bench-scale testing of faecal indicator bacteria survival in marine beach sand near point sources. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (1), 72–84.

More, T.T, Yadav, J.S.S., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental application. *Journal of Environmental Management*, 144, 1-25.

Nagelkerken, I., Connell, S.D., 2015. Global alteration of ocean ecosystem functioning due to increasing human CO₂ emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (43), 13272–13277.

Nguyen, H.T.M, Le, Q.T.P., Garnier, J., Janeau, J.-L, Rochelle-Newall, E., 2016. Seasonal variability of faecal indicator bacteria numbers and die-off rates in the Red River basin, North Viet Nam. *Scientific Reports*, 6 (21644), 1-12.

Nienie, A.B., Sivalingam, P., Laffite, A., Ngelinkoto, P., Otamonga, J.-P., Matand, A., Mulaji, C.K., Biey, E.M., Mpiana, P.T., Poté, J., 2017. Microbiological quality of water in a city with persistent and recurrent waterborne diseases under tropical sub-rural conditions: The case of Kikwit City, Democratic Republic of the Congo. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220, 820–828.

Palazón, A., López, I., Aragonés, L., Villacampa, Y., Navarro-González, F.J., 2017. Modelling of *Escherichia coli* concentrations in bathing water at microtidal coasts. *Science of The Total Environment*, 593–594, 173–18.

Passow, U., Alldredge, A.L., 1995. A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnology and Oceanography*, 40 (7), 1326–1335. in Poças, A., 2014. PhD Thesis on Mechanisms of loose deposits microbiota on the quality of chlorinated distribution systems water. Technical University of Delft, the Netherlands.

Perkins, T.L., Clements, K., Baas, J.H., Jago, C.F., Jones, D.L., Malham, S.K., McDonald, J.E., 2014. Sediment Composition Influences Spatial Variation in the Abundance of Human Pathogen Indicator Bacteria within an Estuarine Environment. *PLOS ONE*, 9 (11), 1–9.

Poças, A., 2014. PhD Thesis on Mechanisms of loose deposits microbiota on the quality of chlorinated distribution systems water. Technical University of Delft, the Netherlands.

Portela, L.I., Ramos, S., Teixeira, A.T., 2013. Effect of salinity on the settling velocity of fine sediments of a harbor basin. *Journal of Coastal Research*, 65, 1188–1193.

Rabalais, N.N., Turner, R.E., Díaz, R.J., Justić, D., 2009. Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science*, 66, 1528–1537.

Ribeiro, F.A.M., 2014. Estudo Laboratorial de Sedimentos Coesivos da Ria de Aveiro. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro e Laboratório Nacional de Engenharia Civil.

Ricardo Mota Pinto-Coelho e Karl Havens, 2016. Gestão de recursos hídricos em tempos de crise. Porto Alegre: Artmed, pp 240.

Rilo, A., Freire, P., Ceia, R., Mendes, R.N., Catalão, J., Taborda, R., 2012. Human effects on estuarine shoreline decadal evolution. *Geophysical Research Abstracts*, 14, EGU2012-10863, EGU General Assembly 2012.

Robins, P.E., Skov, M.W., Lewis, M.J., Giménez, L., Davies, A.G., Malham, S.K., Neill, S.P., McDonald, J.E., Whitton, T.A., Jackson, S.E., Jago, C.F., 2016. Impact of climate change on UK estuaries: A review of past trends and potential projections. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 169, 119–135.

Rochelle-Newall, E., Nguyen, T.M.H., Le, T.P.Q., Sengtaheuanghoung, O., Ribolzi, O., 2015. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems knowledge gap and future directions. Review. *Frontiers in Microbiology*, 6 (308), 1–15.

- Rodrigues, M., Rogeiro, J., David, L., Fortunato, A.B., Oliveira, A., 2016c. Análise de sensibilidade à incerteza dos forçamentos na previsão da qualidade da água em tempo real, Atas do 13º Congresso da Água (Lisboa, Portugal), 15 pp.
- Rodrigues, M., Rosa, A., Cravo, A., Fortunato, A.B., Jacob, J., 2017. Report 1, Characterization of the study areas: Tagus estuary and Ria Formosa. Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Universidade do Algarve.
- Ross, M., Metha, A., 1989. On the mechanics of lutoclines and fluid mud. *Journal of Coastal Research*, 5, 51-61.
- Rozen, Y., Belkin, S., 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 513-529.
- Salgado, J.P., Cabral, H.N., Costa, M.J., 2007. Spatial and temporal distribution patterns of the macrozoobenthos assemblage in the salt marshes of Tejo estuary (Portugal). *Springer* 587, 225 – 239.
- Scully, N.M., Lean, D.R.S., 1994. The attenuation of ultraviolet radiation in temperate lakes. *Arch. Hydrobiol. Belh, Ergebnisse der Limnologie*, 43, 135-144.
- Statham, J.A., McMeekin, T.A., 1994. Survival of faecal bacteria in Antarctic coastal waters. *Antarctic Science*, 6 (3), 333-338.
- Servais, P., Billen, G., Goncalves, A., Garcia-Armisen, T., 2007. Modelling microbiological water quality in the Seine river drainage network: past, present and future situations. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11, 1581-1592, 2007.
- Servais, P., Garcia-Armisen, T., George, I., Billen, G., 2007. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): sources, fate and modelling. *Science of the Total Environment*, 375, 152–167, 2007.
- Statham, P.J., 2012. Nutrients in estuaries - An overview and the potential impacts of climate change. *Science of Total Environment*, 434, 213-227.
- Steets, B.M., Holden, P.A., 2003. A mechanistic model of runoff-associated fecal coliform fate and transport through a coastal lagoon. *Water Research*, 37, 589-608.
- Shang, Q.-q., Fang, H.-w., Zhao, H.-m., He, G.-j., Cui, Z.-h., 2014. Biofilm effects on size gradation, drag coefficient and settling velocity of sediment particles. *International Journal of Sediment Research*, 29, 471-480.
- Sullivan, B.W., Smith, W.K., Townsend, A.R., Nastoia, M.K., Reed, S.C., Chazdon, R.L., Cleveland, C.C., 2014. Spatially robust estimates of biological nitrogen (N) fixation imply substantial human alteration of the tropical N cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (22), 8101–8106.
- Symonds, E.M., Young, S., Verbyla, M.E., McQuaig-Ulrich, S.M., Ross, E., Jiménez, J.A., Harwood, V.J., Breitbart, M., 2017. Microbial source tracking in shellfish harvesting waters in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Water Research*, 111, 177-184.

TAN, X.-I., ZHANG, G.-p., YIN, H., REED, A.H., FURUKAWA, Y., 2012. Characterization of particle size and settling velocity of cohesive sediments affected by a neutral exopolymer. *International Journal of Sediment Research* 27, 473-485.

Tedetti, M., Sempéré, R., 2006. Penetration of Ultraviolet Radiation in the Marine Environment. A Review. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 389-397.

Thoe, W., Wong, S.H.C., Choi, K.W., Lee, J.H.W. (2012). Daily prediction of marine beach water quality in Hong Kong. *Journal of Hydro-environment Research*, 6 (3) 164-180.

van Leussen, W., 1999. The variability of settling velocities of suspended fine-grained sediment in the Ems estuary. *Journal of Sea Research*, 41, 109-118.

Vermeulen, N., Keeler, W.J., Nandakumar, K., Leung, K.T., 2007. The Bactericidal Effect of Ultraviolet and Visible Light on *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 99 (3), 550-556.

Wang, X., Wu, F., Zhu, Q., Huang, S-L., 2017. Long-term changes in the distribution and core habitat use of a coastal delphinid in response to anthropogenic coastal alterations. *Aquatic Conservation: Marine And Freshwater Ecosystems*, 27 (3), 643-652.

Winterwerp, J.C., 2002. On the flocculation and settling velocity of estuarine mud. *Continental Shelf Research*, 22 (9), 1339-1360.

Whitman, R.L., Nevers, M.B., Korinek, G.C., Byappanahalli, M.N., 2004. Solar and Temporal Effects on *Escherichia coli* Concentration at a Lake Michigan Swimming Beach. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (7), 4276-4285.

WHO - World Health Organization, 2003. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and fresh waters. Geneva.
(http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwg1.pdf)

Yang, Y., Wang, Y. P., Li, C., Gao, S., Shi, B., Zhou, L., Wang, D., Li, G., Dai, C., 2017. On the variability of near-bed floc size due to complex interactions between turbulence, SSC, settling velocity, effective density and the fractal dimension of flocs. *Geo-Marine Letters*, 36, 135-149.

I. Anexos I – fotografias complementares

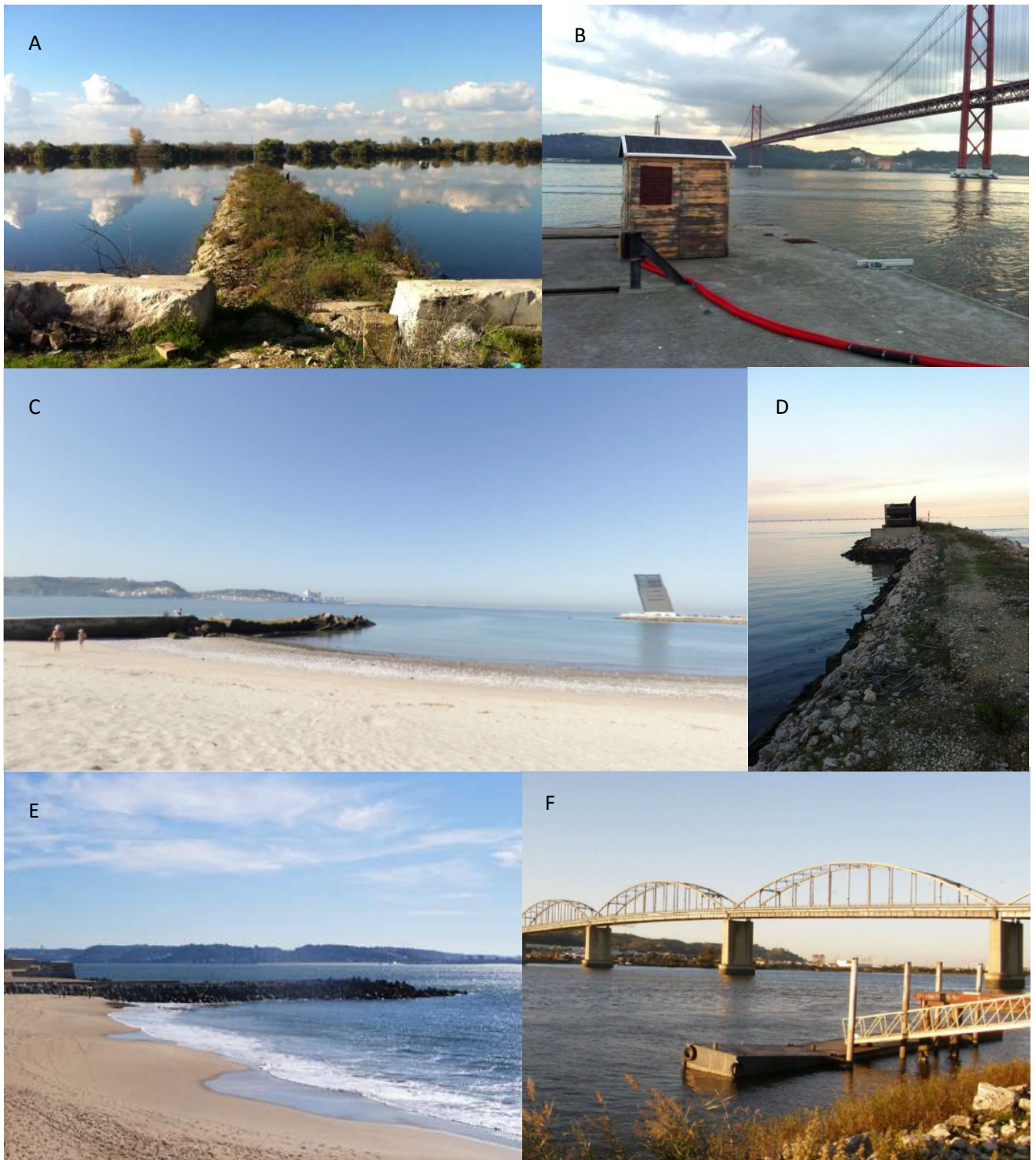


Figura I.1 - Pontos de amostragem. A - Valada, P6; B – Alcântara, P3; C – Algés, P2; D – Parque das Nações, P4; E – Caxias, P1 e F – Vila Franca de Xira, P5. Fotos de Algés, Caxias e de Vila Franca De Xira são do Google maps



Figura I.2 – coluna de sedimentação com suporte para recipientes de recolha de sub-amostra.



Figura I.3 – Recipientes para recolha de sub-amostras dispostos nos tabuleiros do suporte. Imagem de Ribeiro (2014).

II. Anexos II – informação complementar

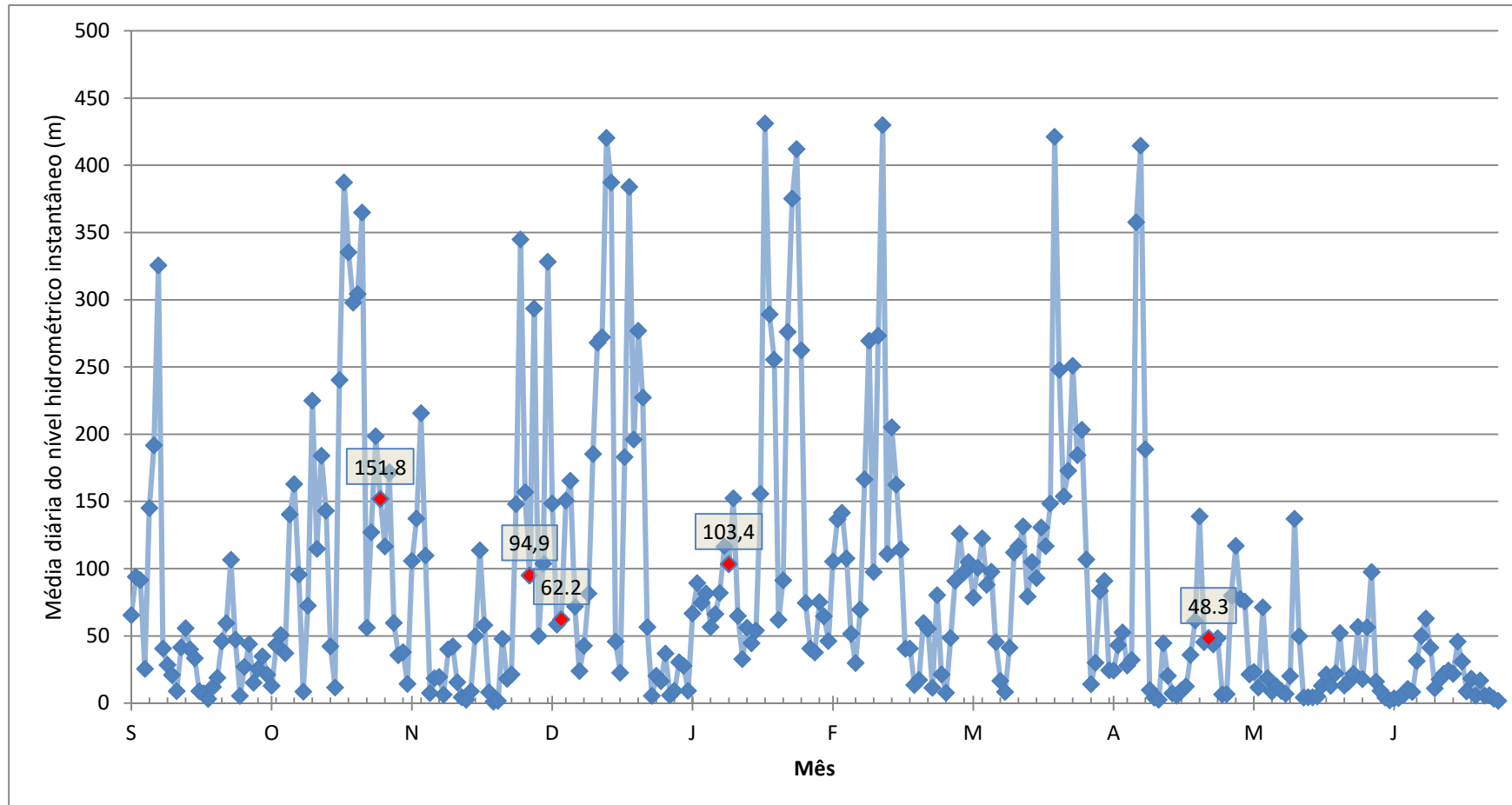


Figura II.1 - Caudal médio diário em Almourol de Setembro de 2016 a Janeiro de 2017. A vermelho caudais nos dias das campanhas.

Tabela II.1 – Horas a que foram realizadas as colheitas na campanha de 11 de Janeiro.

Campanha de 11 de Janeiro			
Ponto de colheita	Maré	Profundidade	Hora
Algés	Preia-mar	Superfície	14h31
		Fundo	14h35
	Baixa-mar	Superfície	8h05
		Fundo	8h07
Alcântara	Preia-mar	Superfície	15h16
		Fundo	15h18
	Baixa-mar	Superfície	9h28
		Fundo	9h31
Parque das Nações	Preia-mar	Superfície	16h06
		Fundo	16h36
	Baixa-mar	Superfície	11h29
		Fundo	11h33

Tabela II.2 – Resultados das análises em laboratório para as campanhas de 28 de Novembro, 5 de Dezembro e de 27 de Abril.

Campanhas	28 de Novembro		5 de Dezembro		27 de Abril	
Ponto de amostragem	pH	CE (mS/cm)	pH	CE (mS/cm)	pH	CE (mS/cm)
P1 - Caxias	7,8	51,2	-	-	-	-
P2 - Algés	7,7	54,1	-	-	7,7	52,8
P3 - Alcântara	7,8	50,9	31,9	7,14	7,6	51,1
P4 - P. Nações	7,8	49,1	-	-	7,7	46,5
P5 - V.F. Xira	8,1	0,631	-	-	-	-
P6 - Valada	7,8	0,526	-	-	-	-

Tabela II.3 - Resultados das análises em laboratório para a campanha de 11 de Janeiro.

Campanha de 11 de Janeiro				
Ponto de colheita	Maré	Profundidade	pH	CE (mS/cm)
Algés	Preia-mar	Superfície	8,0	55,3
		Fundo	8,0	56,7
	Baixa-mar	Superfície	7,9	53,2
		Fundo	7,9	53,3
Alcântara	Preia-mar	Superfície	7,9	55,8
		Fundo	8,0	56,9
	Baixa-mar	Superfície	7,6	44,4
		Fundo	7,8	48,0
Parque das Nações	Preia-mar	Superfície	7,9	51,8
		Fundo	7,9	50,4
	Baixa-mar	Superfície	7,9	46,7
		Fundo	7,9	46,6

Tabela II.4 – Absorvâncias para três comprimentos de onda de radiação UV nas amostras da campanha de 11 de Janeiro.

Ponto de amostragem	Maré	Profundidade	Absorvância		
			280 nm	300 nm	320 nm
Algés	Preia-mar	Superfície	0,0342	0,0290	0,0137
		Fundo	0,0332	0,0282	0,0175
	Baixa-mar	Superfície	0,1554	0,1410	0,0172
		Fundo	0,1823	0,1679	0,0172
Alcântara	Preia-mar	Superfície	0,0392	0,0343	0,0214
		Fundo	0,0520	0,0468	0,0145
	Baixa-mar	Superfície	0,0744	0,0594	0,0534
		Fundo	0,0550	0,0425	0,0334
Parque das Nações	Preia-mar	Superfície	0,0737	0,0639	0,0302
		Fundo	0,1678	0,1492	0,0277
	Baixa-mar	Superfície	0,1271	0,1117	0,0417
		Fundo	0,1326	0,1157	0,0393

Tabela II.5 – Resultados de SST e velocidades de queda para ensaio com amostra de Algés.

Amostra	Dt (min)	SST (g/L)					W _s ⁿ (mm/s)
		tabuleiro 7	tabuleiro 8	tabuleiro 9	tabuleiro 10	média dos tabuleiros	
1	0	1,4139	1,5023	1,6319	1,5383	1,5216	
2	1	1,4220	1,5483	1,5000	1,5615	1,5080	0,11
3	6	0,7308	0,9800	0,9791	1,0468	0,9342	1,46
4	16	0,4184	0,5282	0,5522	0,5747	0,5184	0,91
5	36	0,2513	0,3092	0,3297	0,3426	0,3082	0,37
6	66	0,1448	0,2273	0,2280	0,2340	0,2085	0,16
7	106		0,1540	0,1628	0,1882	0,1683	0,06
8	156		0,1314	0,1303	0,1237	0,1285	0,06
9	216		0,1321	0,1141	0,1132	0,1198	0,01
10	306		0,0807	0,0832	0,0796	0,0812	0,04

Tabela II.6 - Resultados de SST e velocidades de queda para ensaio com amostra de Alcântara.

Amostra	Dt (min)	SST (g/L)					W _s ⁿ (mm/s)
		tabuleiro 7	tabuleiro 8	tabuleiro 9	tabuleiro 10	média dos tabuleiros	
1	0	0,2178	0,2089	0,2063	0,2152	0,212050	
2	1	0,1953	0,1900	0,2023	0,2120	0,199900	0,80
3	6	0,1574	0,1812	0,1847	0,1862	0,177375	0,32
4	16	0,1172	0,1388	0,1565	0,1604	0,143225	0,28
5	36	0,0789	0,0986	0,1141	0,1149	0,101625	0,23
6	66	0,0527	0,0724	0,0821	0,0842	0,072850	0,14
7	106	0,0417	0,0585	0,0642	0,0642	0,057150	0,09
8	156	0,0397	0,0400	0,0412	0,0474	0,042075	0,06
9	216		0,0266	0,0462	0,0368	0,036533	0,02
10	306		0,0267	0,0178	0,0389	0,027800	0,03

Tabela II.7 - Resultados de SST e velocidades de queda para ensaio com amostra do Parque das Nações.

Amostra	Dt (min)	SST (g/L)					W _s ⁿ (mm/s)
		tabuleiro 7	tabuleiro 8	tabuleiro 9	tabuleiro 10	média dos tabuleiros	
1	0	0,9923	1,1080	0,9758	0,9872	1,015825	
2	1	0,9563	1,0573	1,0074	1,0183	1,009825	0,08
3	6	0,9278	1,0048	1,0263	1,0747	1,008400	0,003
4	16	0,7164	0,9449	0,9315	0,9733	0,891525	0,15
5	36	0,4321	0,4634	0,5817	0,4859	0,490775	0,45
6	66	0,2796	0,2892	0,3809	0,3126	0,315575	0,19
7	106	0,1702	0,1764	0,1947	0,1925	0,183450	0,18
8	156		0,1627	0,1483	0,1370	0,149333	0,04
9	216		0,0731	0,0823	0,1079	0,087767	0,10
10	306		0,0594	0,1652	0,0828	0,071100	0,02

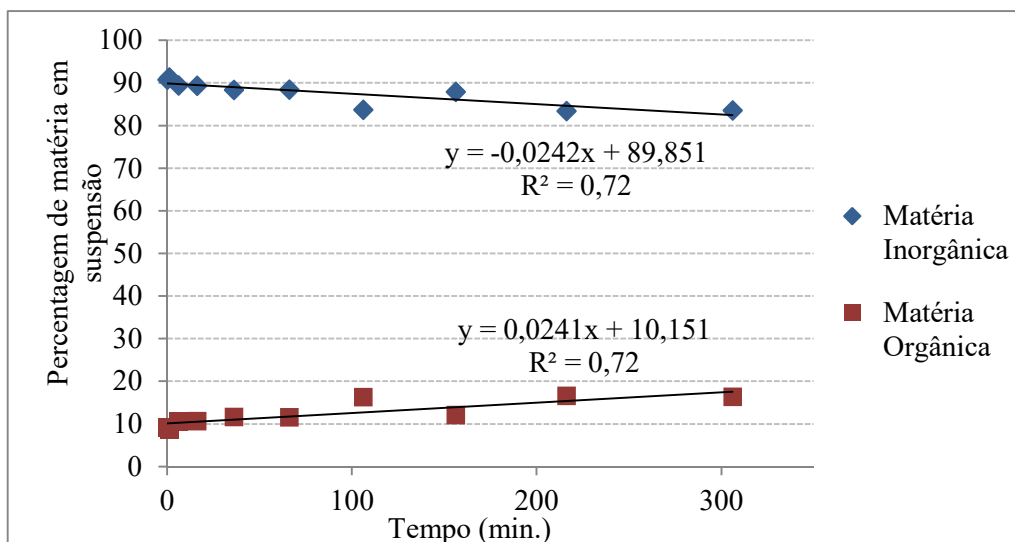


Figura II.2 - Evolução da proporção média de matéria orgânica e inorgânica em suspensão durante o ensaio com a amostra de Algés.

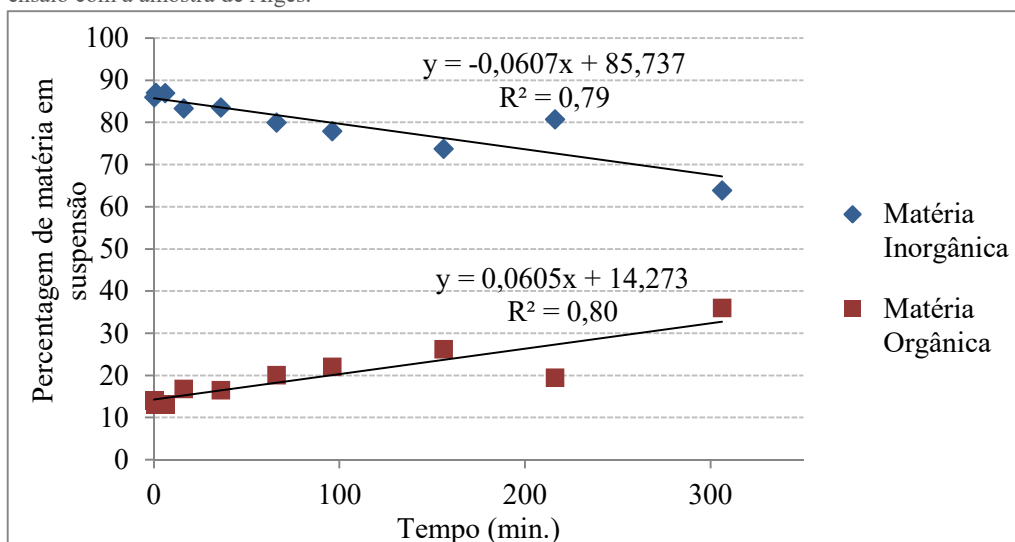


Figura II.3 - Evolução da proporção média de matéria orgânica e inorgânica em suspensão durante o ensaio com a amostra de Alcântara.

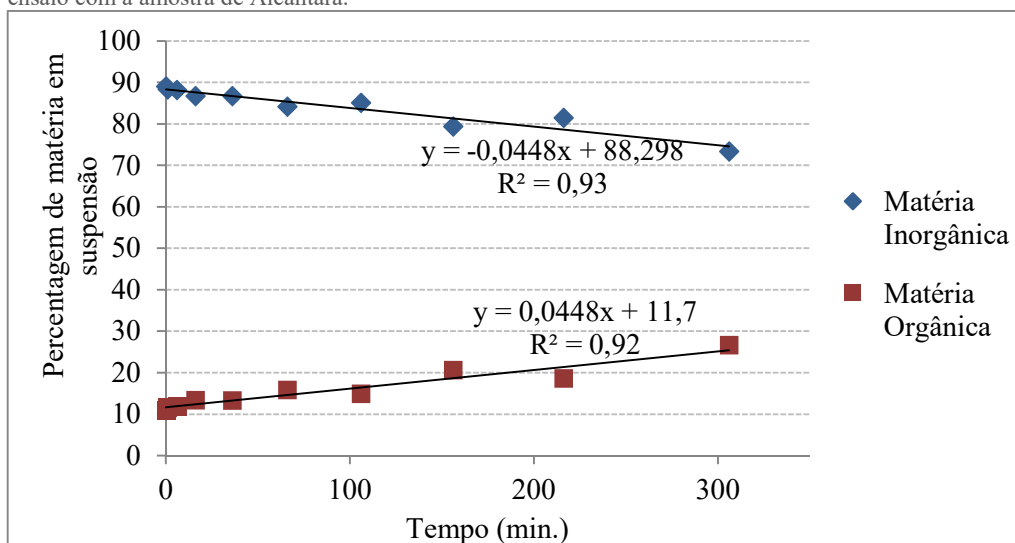


Figura II.4 - Evolução da proporção média de matéria orgânica e inorgânica em suspensão durante o ensaio com a amostra do Parque das Nações.